

# **Charakterisierung der Tumorzone und der Invasionszone humaner Glioblastome**

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von**

**Stefanie Maria Kellmann**

**geboren am 07.12.1983 in Waltershausen**

**Gutachter:**

**1. Prof. Dr. med. Rolf Kalff**, Klinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena

**2. Prof. Dr. med. Utz Settmacher**, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena

**3. Prof. Dr. med. Gabriele Schackert**, Klinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus

**Tag der öffentlichen Verteidigung:**

02. März 2010

## 1 Abkürzungsverzeichnis

°C	-	Grad Celsius
ATP	-	Adenosintriphosphat
Ca <sup>2+</sup>	-	Calciumion
cm	-	Zentimeter
Faktor IIa	-	Aktivierter Gerinnungsfaktor II, entspricht Thrombin
Faktor Va	-	Aktivierter Gerinnungsfaktor V
Faktor VIIa	-	Aktivierter Gerinnungsfaktor VII
Faktor VIIIa	-	Aktivierter Gerinnungsfaktor VIII
Faktor IXa	-	Aktivierter Gerinnungsfaktor IX
Faktor Xa	-	Aktivierter Gerinnungsfaktor X
FGFR	-	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (fibroblast growth factor receptor)
FSU	-	Friedrich-Schiller-Universität Jena
GFAP	-	Saures Gliafaserprotein (Glial fibrillary acidic protein)
g	-	Gramm
h	-	Stunden
H/E	-	Hämatoxylin/Eosin
HNK-1	-	Human natural killer-1
ICAM	-	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül (Intercellular cell adhesion molecule)
Ig	-	Immunglobulin
IL-8	-	Interleukin 8
kDa	-	Kilodalton
l	-	Liter
ml	-	Milliliter
MMP	-	Matrixmetalloproteinase
MMP-2	-	Matrixmetalloproteinase 2
mRNA	-	Boten-RNA (messenger ribonucleic acid)
MRT	-	Magnetresonanztomographie
mt1-MMP	-	Membranassoziierte Matrixmetalloproteinase 1 (membrane type 1 matrix metalloproteinase)
NCAM	-	Neurales Zelladhäsionsmolekül (Neural cell adhesion molecule)
NCAM-120	-	Neurales Zelladhäsionsmolekül Isoform 120
NCAM-140	-	Neurales Zelladhäsionsmolekül Isoform 140
NCAM-180	-	Neurales Zelladhäsionsmolekül Isoform 180
PAR	-	Proteaseaktivierter Rezeptor
PSA	-	Polysialic Acid
RT-PCR	-	Real-Time-Polymerasekettenreaktion
TAG-1	-	Transiently expressed axonal glycoprotein-1
TF	-	Gewebefaktor (Tissue factor)
TIMP	-	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TNM	-	Tumor Nodes (=Lymphknoten) Metastasen
UPA	-	Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivator
VASE	-	Variable domain alternatively spliced exon
VCAM	-	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül (Vascular cell adhesion molecule)
VEGF	-	Vascular endothelial growth factor
WHO-Grad	-	Einteilung gemäß World Health Organization
ZNS	-	Zentrales Nervensystem
µl	-	Mikroliter
µm	-	Mikrometer

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>2 Zusammenfassung</b>	<b>IV</b>
<b>3 Einleitung</b>	<b>1</b>
3.1 Gliazellen und ihre Bedeutung	<b>1</b>
3.1.1 Astrozyten.....	1
3.1.2 Oligodendrozyten.....	2
3.1.3 Mikroglia.....	2
3.1.4 Ependymzellen.....	2
3.2 Gliome des Menschen	<b>2</b>
3.2.1 Charakteristika von Gliomen als Hirntumore.....	2
3.2.2 Klassifikation der Gliome.....	4
3.2.3 Funktionsweise und Bedeutung von NCAM.....	4
3.2.4 Astrozytome.....	5
3.3 Das Neurale Zelladhäsionsmolekül (NCAM)	<b>6</b>
3.3.1 Klassifikation Struktur und Isoformen.....	6
3.3.2 Modifikationen von NCAM.....	7
3.3.3 Funktionsweise und Bedeutung von NCAM.....	7
3.3.4 NCAM-Expression in Gliomen.....	8
3.3.5 Untersuchungen der neurochirurgischen Klinik Jena zur NCAM-140-Expression..	9
3.4 Die Matrixmetalloproteinase 2	<b>10</b>
3.4.1 Klassifikation und Aufbau der Matrixmetalloproteinasen.....	10
3.4.2 Aktivierung und Funktion der Matrixmetalloproteinasen.....	10
3.4.3 Tumorbologische Bedeutung der Matrixmetalloproteinasen.....	11
3.4.4 Die Matrixmetalloproteinase 2 (MMP-2).....	12
3.5 Der Gerinnungsfaktor X	<b>12</b>
3.5.1 Struktur und klassische Funktion des Gerinnungsfaktors X.....	12
3.5.2 Tumorbologische Bedeutung prokoagulatorischer Veränderungen.....	14
3.5.3 Koagulationsunabhängige Wirkungen des Faktors X.....	14
<b>4 Ziele der Arbeit</b>	<b>16</b>
<b>5 Material und Methoden</b>	<b>17</b>
5.1 Materialien und Geräte	<b>17</b>
5.1.1 Gewebeprobe.....	17
5.1.2 Geräte für die histopathologische Untersuchung.....	17
5.1.3 Materialien für die histopathologische Untersuchung.....	18
5.1.4 Zusammensetzung der Lösungen und Puffer.....	19
5.2 Methoden	<b>19</b>
5.2.1 Herstellung der Präparate.....	19
5.2.2 Entparaffinierung und Rehydrierung für die Immunhistochemie.....	19
5.2.3 Entparaffinierung und Rehydrierung für die Hämatoxylin/Eosin (H/E)-Färbung....	20
5.2.4 Immunhistochemische Methode.....	20
5.2.5 Nachweis des gebundenen Primärantikörpers mittels Immundetektion.....	20
5.2.6 Gegenfärbung mit Hämatoxylin.....	21
5.2.7 Hämatoxylin/Eosin-Färbung.....	21
5.3 Auswertungsmethoden	<b>22</b>
5.3.1 Markierung von Tumorzone und Invasionszone.....	22
5.3.2 Makroskopie.....	22
5.3.3 Lichtmikroskopie.....	23
5.3.4 Statistische Auswertung.....	24

<b>6 Ergebnisse</b>	<b>26</b>
6.1 Expression von NCAM-140	<b>26</b>
6.1.1 Makroskopische Bewertung der NCAM-140-Expression.....	26
6.1.1.1 Makroskopische Bewertung von NCAM-140 in den Referenzproben.....	26
6.1.1.2 Makroskopische Bewertung von NCAM-140 in Glioblastomen.....	27
6.1.1.3 NCAM-140-Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Referenzproben.....	28
6.1.2 Lichtmikroskopische Bewertung der NCAM-140-Expression.....	29
6.1.2.1 Lichtmikroskopische Bewertung von NCAM-140 in den Referenzproben	29
6.1.2.2 Lichtmikroskopische Bewertung von NCAM-140 in Glioblastomen.....	31
6.1.2.3 NCAM-140-Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Referenzproben.....	32
6.1.3 Abgrenzbarkeit von Tumorzone und Invasionszone.....	34
6.1.3.1 Ausprägungen der Tumorgrenze.....	34
6.1.3.2 Verhältnis zwischen NCAM-140-Expressionsdichte und Darstellbarkeit der Tumorgrenze.....	38
6.1.4 Vergleich zwischen makroskopischer und lichtmikroskopischer Bewertung.....	38
6.1.5 Darstellung der wichtigsten Ergebnisse der NCAM-140-Expressionsanalyse.....	39
6.2 Expression von MMP-2	<b>41</b>
6.2.1 MMP-2 in den Referenzproben.....	41
6.2.2 MMP-2 in Glioblastomen.....	46
6.2.3 MMP-2-Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Referenzproben.....	54
6.2.4 Darstellung der wichtigsten Ergebnisse der MMP-2-Expressionsanalyse.....	57
6.3 Expression von Faktor X	<b>58</b>
6.3.1 Faktor X in den Referenzproben.....	58
6.3.2 Faktor X in Glioblastomen.....	61
6.3.3 Faktor-X-Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Referenzproben.....	69
6.3.4 Darstellung der wichtigsten Ergebnisse der Faktor-X-Expressionsanalyse.....	72
6.4 Vergleich zwischen der Expression von NCAM-140, MMP-2 und Faktor X	<b>73</b>
6.4.1 Expression der verschiedenen Antigene in den Referenzproben.....	73
6.4.2 Expression der verschiedenen Antigene in den Glioblastomproben.....	74
6.4.3 Darstellung der wichtigsten Ergebnisse des Vergleiches zwischen den Antigenen.	77
<b>7 Diskussion</b>	<b>78</b>
7.1 Einführung	<b>78</b>
7.2 Bewertung der verwendeten Methoden	<b>79</b>
7.2.1 Verwendung von Autopsiegewebe als tumorfreie Referenzproben.....	79
7.2.2 Bewertung der makroskopischen Analyse.....	79
7.2.3 Bewertung der lichtmikroskopischen Analyse.....	80
7.2.4 Bewertung der Differenzierung zwischen Tumor- und Invasionszone.....	81
7.3 Ergebnisse der Expressionsanalyse von NCAM-140	<b>81</b>
7.3.1 Aussagekraft der makroskopischen NCAM-140-Expressionsanalyse.....	81
7.3.2 Lichtmikroskopische Auswertung der NCAM-140-Expression.....	83
7.3.3 Darstellbarkeit der Tumorgrenze.....	85
7.4 Ergebnisse der Expressionsanalyse von MMP-2	<b>86</b>
7.5 Ergebnisse der Expressionsanalyse von Faktor X	<b>89</b>
7.6 Zusammenhänge zwischen der Expression von NCAM-140, MMP-2 und Faktor X	<b>91</b>
7.7 Tumorbologische Bedeutung der untersuchten Antigene	<b>93</b>
<b>8 Schlussfolgerungen</b>	<b>100</b>
<b>9 Literaturverzeichnis</b>	<b>101</b>
<b>10 Anhang</b>	<b>114</b>

## **2 Zusammenfassung**

Glioblastome haben den WHO-Grad IV und gehören zu den Tumoren des neuroepithelialen Gewebes (Louis et al. 2007). Sie sind wenig differenzierte Tumore mit hohem Proliferationspotenzial und einer ausgesprochen ungünstigen Prognose (Schlegel et al. 2003). Auch die aggressiven Therapiestrategien, die sich aus operativer Tumorentfernung, Radio- und Chemotherapie zusammensetzen, vermögen die Prognose bisher nur geringfügig zu verbessern (Weller et al. 2004, Kanu 2009). Es ist daher notwendig, innovative Therapiemöglichkeiten zu etablieren, deren Grundlage ein besseres Verständnis der Tumorbilogie ist.

Glioblastome zeichnen sich in der Tumorzone vermutlich durch andere tumorbiologische Charakteristika aus als in der Invasionszone. Beispielsweise werden sie einerseits durch zentrale Nekrosen und andererseits durch eine periphere Tumorzellinvasion in das umliegende Hirngewebe charakterisiert (Kleihues und Cavenee 2000). Eine eindeutige Tumorgrenze ist durch die starke Zellinvasion so gut wie nie erkennbar. Die verschiedenen tumorbiologischen Eigenschaften von Tumorzone und Invasionszone lassen aber vermuten, dass die molekulare Ausstattung in den beiden Arealen verschieden ist und zur Abgrenzung des Tumors vom peritumoralen Hirngewebe beitragen kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des neuralen Zelladhäsionsmoleküls Isoform 140 (NCAM-140), der Matrixmetalloproteinase 2 (MMP-2) und des Gerinnungsfaktors X in der Tumor- und der Invasionszone in 52 humanen Glioblastomen untersucht und miteinander verglichen. Die Expressionsanalyse erfolgte immunhistochemisch unter Verwendung polyklonaler Primärantikörper. Zwanzig Proben tumorfreier grauer und weißer Hirnsubstanz standen als Referenzgewebe zur Verfügung. Die Färbeintensität, die den Grad der Antigenexpression widerspiegelt, wurde im Zusammenhang mit dem Anteil antigenpositiver Zellen lichtmikroskopisch bewertet. Für NCAM-140 erfolgte zusätzlich eine makroskopische Bewertung. Die Tumor- und die Invasionszone der Glioblastome wurden jeweils getrennt analysiert. Ihre Antigenexpression wurde mit Hilfe statistischer Verfahren verglichen.

Die lichtmikroskopische Expressionsanalyse ergab eine mit signifikanten Unterschieden stufenweise abnehmende NCAM-140-Expression von der NCAM-140-reichen grauen Substanz tumorfreien Referenzgewebes über die Invasionszone der Glioblastomproben bis hin zu ihrer Tumorzone. Diese war zu 85% durch eine negative oder sehr schwache NCAM-140-Expression gekennzeichnet. Ein Verlust von NCAM, wie er in den Glioblastomen beobachtet wurde, scheint sowohl die Proliferation als auch die Invasion von Tumoren zu beeinflussen (Edvardsen et al. 1994, Owens et al. 1998).

Zusätzlich wurde in 75,6% der Glioblastome anhand der NCAM-140-Expression eine Abgrenzbarkeit des Tumors vom peritumoralen Hirngewebe beobachtet. Die makroskopische Analyse der NCAM-140-Expression erbrachte vergleichbare Ergebnisse. Anwendung könnte die Methode intraoperativ finden, um eine grobe Orientierung zu ermöglichen.

MMP-2 gehört aufgrund seiner proteolytischen Fähigkeiten zu den für die Invasion wesentlichen Faktoren (McCawley und Matrisian 2000). Die MMP-2-Expression der Tumor- und der Invasionszone der Glioblastome war in der vorliegenden Arbeit signifikant stärker als die des tumorfreien Referenzgewebes, das nur in einzelnen Endothelzellen MMP-2 exprimierte. Bei der Beurteilung der gesamten Tumorzone wurde in 69% der Proben MMP-2 beobachtet. Signifikante Unterschiede zur Invasionszone, die in 54% der Proben MMP-2 exprimierte, bestanden nicht. Vor diesem Hintergrund könnte die zunächst ähnlich erscheinende MMP-2-Expression beider Gewebeanteile durch eine stärkere MMP-2-Expression der Tumorzellen der Invasionszone verursacht sein, da der Anteil von Tumorzellen in diesem Tumorbereich geringer ist. Weiterhin war die beobachtete MMP-2-Expression der Zellen der Pseudopalisaden signifikant stärker als die der Zellen der Invasionszone und tendenziell stärker als die der Zellen der Tumorzone. Blutgefäße waren in 95% der Glioblastomproben MMP-2-positiv und wiesen eine signifikant stärkere Expression in den einschichtigen als in den mehrschichtigen Gefäßen der Tumorzone auf. Die MMP-2-Expression der Gefäße war in den Glioblastomen signifikant stärker als in den Referenzproben. Dies könnte auf eine Funktion von MMP-2 im Rahmen der Angiogenese hinweisen.

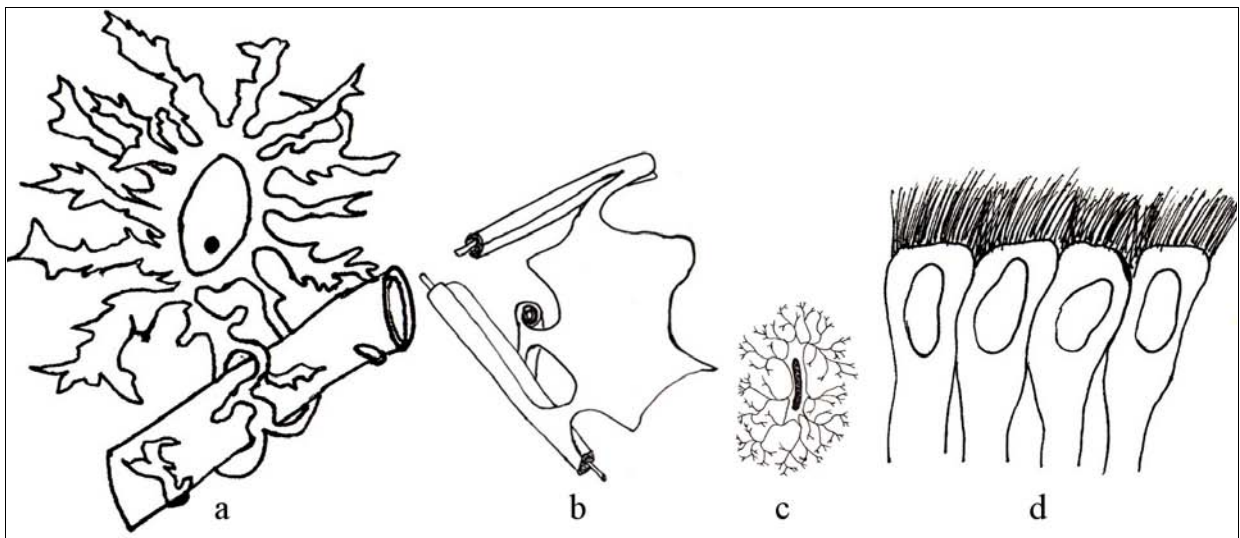
Der Gerinnungsfaktor X vermag neben seinem Einfluss auf die Koagulation die Proliferation von Zellen über proteaseaktivierte Rezeptoren (PARs) zu fördern (Ossovskaya und Bunett 2004). In den Glioblastomproben fiel bei der Auswertung der Faktor-X-Expression eine bislang nicht beschriebene signifikante Hochregulation des Proteins gegenüber dem tumorfreien Referenzgewebe auf, welches vereinzelt schwach positiv für den Faktor X war. Dabei zeigte sich eine signifikant stärkere Expression des Faktors X in der Tumorzone als in der Invasionszone. Insgesamt war in 92% der Proben eine Faktor-X-Positivität der Tumorzone zu verzeichnen. Das Endothel von Blutgefäßen exprimierte in 69% der Glioblastomproben Faktor X. Die Expression der Gefäße des Referenzgewebes war signifikant geringer.

Letztlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die analysierten Proteine mit einer Abgrenzbarkeit des Tumors vom peritumoralen Gewebe assoziiert sind. Die Klärung ihrer Bedeutung im Rahmen der Tumorprogression sowie die Untersuchung der Tumor- und der Invasionszone auf das Vorhandensein zusätzlicher Unterscheidungskriterien bedarf weiterer Untersuchungen.

### 3 Einleitung

#### 3.1 Gliazellen und ihre Bedeutung

Gliazellen stellen das Stütz- und Ernährungsgewebe des Nervensystems dar (Schirmer 2005). Sie machen nahezu die Hälfte des Volumens des ZNS aus und bilden 90% seiner Zellen. Während im peripheren Nervensystem nur ein Typus glialer Zellen beobachtet wurde, gibt es im ZNS vier verschiedene Arten mit sehr unterschiedlicher Funktion und Morphologie: Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikroglia und Ependymzellen (Trepel 2008) (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Darstellung der Gliazelltypen** (modifiziert nach Kahle und Frotscher 2002 und nach Trepel 2008)  
(a) Astrozyt, (b) Oligodendrozyt, (c) Mikroglia, (d) Ependymzellen

##### 3.1.1 Astrozyten

Dieser Zelltyp verdankt seinen Namen dem sternförmigen Aussehen (Trepel 2008). Astrozyten sind die größten Gliazellen (Hees und Sinowatz 2000). Aufgrund der Zytoplasmafortsätze unterscheidet man zwei Subtypen: fibrilläre Astrozyten mit schlanken, wenig verzweigten Fortsätzen und protoplasmatische Astrozyten mit reicher verzweigten dickeren Fortsätzen (Trepel 2008). Ein immunhistologisch bedeutsames Charakteristikum ist das Vorhandensein zytoplasmatischer Intermediärfilamente, die aus dem sauren fibrillären Gliaprotein (GFAP) bestehen und sich zu Fibrillen zusammenlagern (Junqueira und Carneiro 2005).

Die Funktionen von Astrozyten sind vielfältig. Wesentlich ist ihre strukturgebende Stützfunktion ähnlich der des Bindegewebes im übrigen Körper. Entsprechend proliferieren sie im Falle eines Zellunterganges und bilden sogenannte Glianarben. Weiterhin dienen sie dem Stofftransport und bilden mit ihren perivaskulären Fortsätzen einen Teil der Blut-Hirn-Schranke. Daneben nehmen sie Funktionen im Bereich der Neuronendifferenzierung, deren



Axonwachstum und der Synapsenbildung wahr und beteiligen sich an der Rückaufnahme von Transmittern aus dem Extrazellarraum sowie immunologischen Funktionen (Trepel 2008).

### **3.1.2 Oligodendrozyten**

Oligodendrozyten zeichnen sich durch wenige kurze und kaum verzweigte Fortsätze aus. Mit diesen umhüllen sie die neuronalen Fortsätze und dienen somit der Markscheidenbildung, die eine elektrische Isolierung der Nervenzellen bewirkt (Trepel 2008).

### **3.1.3 Mikroglia**

Diese kleinen Zellen zeigen die größte Formvariabilität aller Zellen des ZNS und sind im Gegensatz zu den anderen Zellen nicht ortsständig (Trepel 2008). Sie tragen mehrere feine, stark verzweigte Fortsätze, bewegen sich im Falle von pathologischen Prozessen amöboid und können dabei ihre Form ständig verändern (Hees und Sinowatz 2000). Entsprechend ihrer entwicklungsgeschichtlichen Herkunft, nach der sie ins ZNS eingewanderte Makrophagen sind, stellen sich auch ihre Funktionen dar: Sie phagozytieren untergegangene Gewebereste und Antigen-Antikörper-Komplexe im Sinne einer Aufräumfunktion. Bei immunologischen Abwehrvorgängen des Gehirns spielen sie eine Schlüsselrolle, zumal sie eingedrungene Mikroorganismen auch direkt zerstören können (Trepel 2008).

### **3.1.4 Ependymzellen**

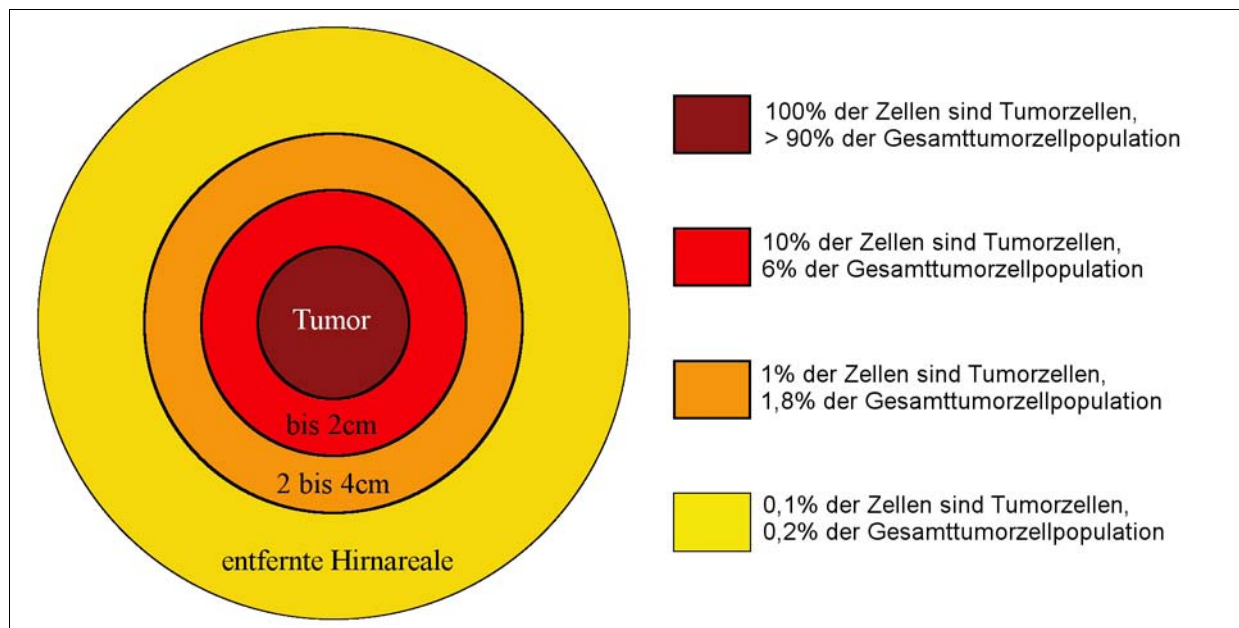
Ependymzellen ähneln morphologisch iso- bis hochprismatischen Epithelzellen. Sie bilden die Auskleidung der inneren Liquorräume und sind an der Bildung der Liquor-Hirn-Schranke beteiligt. Durch ihre oberflächlichen Kinozilien dienen sie dem Liquortransport sowie durch Mikrovilli verschiedenen Sekretions- und Resorptionsvorgängen (Trepel 2008).

## **3.2 Die Gliome des Menschen**

### **3.2.1 Charakteristika von Gliomen als Hirntumore**

Aufgrund ihrer intrazerebralen Lage unterscheiden sich Hirntumore von anderen Tumorerkrankungen grundlegend, weshalb eine Einteilung ihrer Dignität nach dem klassischen TNM-System wenig sinnvoll ist. Als raumfordernder Prozess können sie unabhängig von ihrem WHO-Grad zu lebensbedrohlichen Hirndrucksteigerungen führen. Ihre Lokalisation spielt bezüglich Funktionsausfällen eine überragende Rolle und selbst Tumore mit einem niedrigen WHO-Grad haben eine ausgeprägte Tendenz zur Infiltration in das umliegende Gewebe (Schlegel et al. 2003). Tumorzellen von Gliomen wandern in unterschiedlichem Maß entlang

vorgegebener Bahnen, z.B. des Corpus callosum, der Pyramidenbahn oder Blutgefäßen, und führen daher auch nach scheinbar vollständiger Tumorresektion zu Rezidiven (Moskopp und Wassmann 2005).



**Abbildung 2: Migrationsverhalten von Gliomzellen** (modifiziert nach Moskopp und Wassmann 2005)

In 2cm Abstand zum eigentlichen Tumor befinden sich noch sechs Prozent der gesamten Tumorzellpopulation, was einen Zellanteil von zehn Prozent in dieser Region ausmacht. In 2 bis 4cm Abstand zum makroskopisch sichtbaren Tumor ist noch jede hundertste Zelle neoplastisch, in der anderen Hemisphäre jede tausendste (Moskopp und Wassmann 2005 (Abbildung 2).

**Tabelle 1: Dignität von Hirntumoren nach den WHO-Kriterien** (nach Schirmer 2005)

WHO-Grad	Zelldichte	Zellmorphologie	Mitosen	Gefäßwandproliferation	Nekrosen
<b>I</b>	gering	gleichförmige Zellen	keine atypischen	keine	keine
<b>II</b>	gering - mäßig	Unregelmäßigkeiten von Größe, Form und Chromatingehalt der Kerne	keine atypischen	keine	keine
<b>III</b>	erheblich	starke Zell- und Kernpolymorphie	zahlreiche, teilweise atypische	möglich	keine
<b>IV</b>	hoch	starke Zell- und Kernpolymorphie, Riesenzellen	zahlreiche atypische	erheblich	ausgedehnte, oft mit umgebenden Pseudopalisaden

Hirntumore haben eine Tendenz zu fortschreitender Malignisierung in ihrem klinischen Verlauf, während sie andererseits fast nie in andere Gewebe metastasieren (Schlegel et al. 2003). Die derzeit gebräuchliche Einteilung der Dignität unterliegt daher histologischen Kriterien (Louis et al. 2007). Hierbei entspricht ein Tumor mit dem WHO-Grad I einem hoch

differenzierten Tumor mit langsamer Wachstumstendenz und günstiger Prognose, während ein WHO-Grad IV einen wenig differenzierten Tumor mit hohem Proliferationspotenzial und äußerst ungünstiger Prognose charakterisiert (Schlegel et al. 2003) (Tabelle 1).

### 3.2.2 Klassifikation der Gliome

Gliome gelten als primäre Hirntumore und gehören in die Gruppe der neuroepithelialen Tumore (Greenberg 2006, Schirmer 2005). Entsprechend der morphologischen Ähnlichkeit der neoplastischen Zellen zu Gliazellen und ihrer vermutlichen histogenetischen Herkunft aus diesen oder Vorläuferzellen (Graham und Lantos 2002, Schlegel et al. 2003) unterscheidet man im Wesentlichen drei Gruppen von Gliomen (Tabelle 2): Astrozytome, Oligodendrogliome und Ependymome. Im Falle eines gleichzeitigen Vorhandenseins verschiedener Komponenten werden sie auch als Mischgliome bezeichnet (Thomas 2006).

**Tabelle 2: Die häufigsten Gliome entsprechend ihres WHO-Grades und ihres Phänotyps**  
(nach Louis et al. 2007)

WHO-Grad	Astrozytom	Oligodendrogliom	Ependymom	Mischgliom
I	pilozytisch	-----	Subependymom	-----
II	diffus: 1) fibrillär 2) gemistozytisch 3) protoplasmatisch	niedriggradig	niedriggradig	niedriggradig
III	anaplastisch	anaplastisch	anaplastisch	anaplastisch
IV	Glioblastoma multiforme	-----	-----	-----

### 3.2.3 Klinische Aspekte der Gliome

Gliome haben eine Inzidenz von etwa 6/100.000 Einwohner pro Jahr. Je nach Lokalisation führen sie, wie auch andere intrazerebrale Tumore, zu zerebralorganischen Krampfanfällen, neurologischen Herdsymptomen, Persönlichkeitsveränderungen und Zeichen erhöhten Hirndrucks einschließlich Kopfschmerzen (Weller 2004, Schirmer 2005). Bei einem klinischen Verdachtsmoment ist das MRT des Schädels ohne und mit Kontrastmittel die diagnostische Methode der Wahl. Diese wird gefolgt von einer histologischen Diagnosesicherung mittels einer stereotaktischen Biopsie oder einer primären Operation. Die Therapie erfolgt abhängig vom festgestellten Tumortyp und WHO-Grad zum Einen durch operative Tumorentfernung unter der Berücksichtigung resultierender neurologischer Defizite. Eine vollständige Resektion ist jedoch aufgrund des infiltrativen Wachstums der Gliome kaum möglich. Andererseits werden zur Behandlung die fokussierte Strahlentherapie sowie die chemotherapeutische Behandlung eingesetzt (Weller 2004). Obgleich bei den Gliomen, insbesondere den höhergradigen, eine ausgeprägte intratumorale Heterogenität besteht und unterschiedlich

differenzierte Anteile nebeneinander liegen, muss bei der Prognosebestimmung immer von dem höchstgradigen Anteil ausgegangen werden. Drei unabhängige Faktoren bestimmen die Prognose: das Patientenalter, das histologische Grading des Tumors und der klinische Zustand bei Diagnosestellung (Moskopp und Wassmann 2005).

### **3.2.4 Astrozytome**

#### **3.2.4.1 Allgemeine Charakterisierung**

Die neoplastischen Zellen astrozytärer Tumore ähneln in ihrem phänotypischen Verhalten Astrozyten und können daher oft auch über den immunhistologischen Nachweis des GFAP diagnostiziert werden (Thomas 2006, Graham und Lantos 2002). In Tabelle 2 befindet sich eine Übersicht über die häufigsten Astrozytome entsprechend ihres WHO-Grades. Dabei besteht ein zahlenmäßiges Verhältnis zwischen Glioblastomen, anaplastischen Astrozytomen und niedriggradigen Astrozytomen (WHO-Grad II) von 5:3:2. Die höhergradigen Tumore sind also häufiger (Greenberg 2006). Dieser Zusammenhang wird noch dadurch betont, dass den niedriggradigen Tumoren eine inhärente Tendenz zur malignen Progression innewohnt (Moskopp und Wassmann 2005).

#### **3.2.4.2 Glioblastome**

Glioblastome werden den Astrozytomen zugerechnet, haben immer den WHO-Grad IV und bestehen aus entdifferenzierten neoplastischen Zellen (Thomas 2006). Charakteristisches Diagnosekriterium ist das Auftreten von Nekrosen und mikrovaskulären Proliferaten, die aus zahlreichen vergrößerten, sich schnell teilenden Endothelzellen, Perizyten und glatten Muskelzellen bestehen (Brat und Van Meir 2004, Louis et al. 2007). Dabei sind die Nekrosen häufig von radial orientierten, dicht gepackten, kleinen, fusiformen Gliomzellen umgeben, die aufgrund ihrer Formation als Pseudopalisaden bezeichnet werden.

Meist manifestieren sich Glioblastome nach einer kurzen Anamnese ohne Nachweis einer Vorstufe mit niedrigerem WHO-Grad als primäres Glioblastom, doch können sie sich auch aus Astrozytomen des WHO-Grades II oder III entwickeln und sind dann sekundäre Glioblastome. Die Begriffe Glioblastom und Glioblastoma multiforme werden synonym verwendet (Kleihues und Cavenee 2000). Dabei leitet sich letztere Bezeichnung von dem bunten Bild der Tumorschnittfläche ab. Diese ist durch Einblutungen, Nekrosen, zystische Veränderungen und narbige Reaktionen gekennzeichnet (Schlegel et al. 2003). Dabei kann die zentrale Nekrose einen Anteil von 80% der gesamten Tumormasse ausmachen. Ausgedehnte Einblutungen bewirken, dass die ersten klinischen Symptome gelegentlich als Schlaganfall verkannt werden

(Kleihues und Cavenee 2000). Makroskopisch zeigt sich zudem meist ein ausgeprägtes perifokales Ödem mit Massenverschiebung (Schlegel et al. 2003).

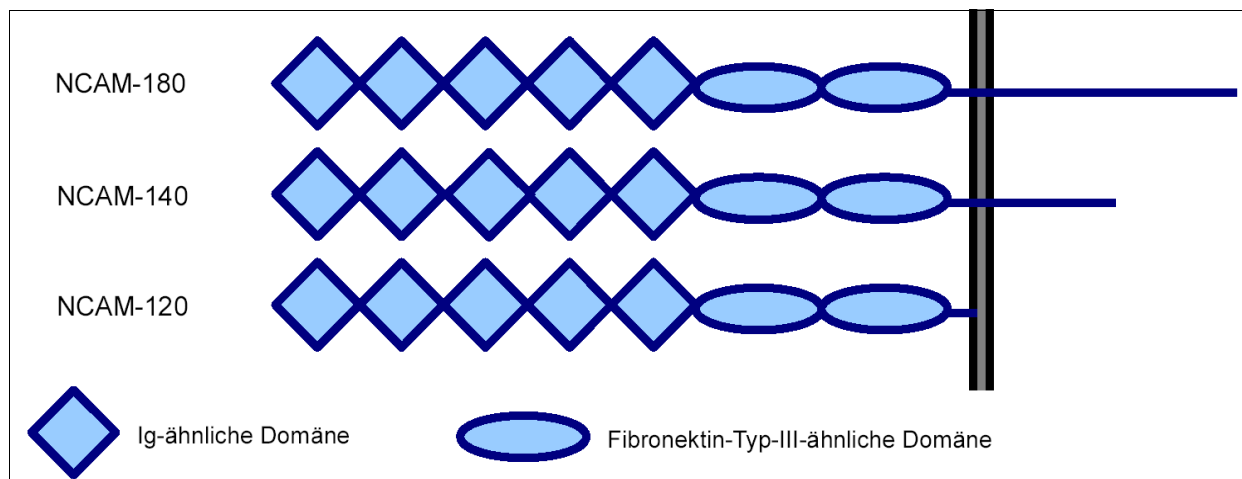
Das Glioblastom ist mit einem Anteil von 12 - 15% der häufigste Hirntumor und stellt einen Anteil von ca. 50% aller Gliome (Kleihues und Cavenee 2000, Moskopp und Wassmann 2005). Es kann in jedem Alter auftreten, hat aber seinen Häufigkeitsgipfel zwischen dem 45. und 70. Lebensjahr mit einem Verhältnis zwischen Männern und Frauen von 1,5:1. Die häufigste Lokalisation ist in den Großhirnhemisphären, insbesondere den frontotemporalen und parietalen Regionen. Oft infiltrieren Glioblastome über das Corpus callosum in die kontralaterale Hemisphäre und führen somit zu symmetrischen, bilateralen Läsionen, den sogenannten Schmetterlingsgliomen. Auch Invasionen in die Basalganglien werden beobachtet. Auf diese Art und Weise entsteht gelegentlich das Bild multifokaler Glioblastome, die aber selten wirklich voneinander unabhängige Tumore darstellen. Eine Metastasierung über den Liquor oder das Blut bildet die Ausnahme (Kleihues und Cavenee 2000).

### **3.3 Das Neurale Zelladhäsionsmolekül (NCAM)**

#### **3.3.1 Klassifikation, Struktur und Isoformen**

Das Neurale Zelladhäsionsmolekül (NCAM) war das erste Immunglobulin (Ig)-ähnliche Zelladhäsionsmolekül, das isoliert und ausführlich charakterisiert wurde. Es bildet den Prototyp der großen Untergruppe von Zelladhäsionsmolekülen des Nervensystems in der Ig-Superfamilie. Die Mitglieder der NCAM-Subfamilie bestehen aus fünf Ig-ähnlichen und zwei Fibronektin-Typ-III-ähnlichen Domänen (Cunningham et al. 1987, Crossin und Krushel 2000). Von NCAM wiederum existieren eine ganze Reihe von Isoformen, wesentlich sind jedoch drei: NCAM-120, -140 und -180, die ihre Bezeichnung aufgrund ihres Molekulargewichts in kDa erhielten. Sie entstehen durch alternatives Spleißen des primären Gentranskriptes (Crossin und Krushel 2000). Während NCAM-140 und NCAM-180 transmembrane Formen mit einer unterschiedlich langen zytoplasmatischen Domäne darstellen, ist NCAM-120 durch einen Glykosylphosphatidyl-Inositol-Anker an die Membran gebunden (Abbildung 3). Daneben existieren lösliche Formen von NCAM im Gehirn, in Liquor und im Blut, die primär ohne transmembrane Domäne exprimiert oder nachträglich proteolytisch verkürzt wurden (Rønn et al. 1998).

Als Zelladhäsionsmolekül des Nervensystems findet man NCAM vornehmlich auf Nervenzellen, doch wird es je nach Isoform auch von glialen Zellen exprimiert. Ein Beispiel hierfür stellt NCAM-140 dar (Rønn et al. 1998, Walmod et al. 2004).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der drei Hauptisoformen von NCAM** (modifiziert nach Rønn et al. 1998) Jedes der Proteine besteht aus fünf Ig-ähnlichen und zwei Fibronektin-Typ-III-ähnlichen Domänen. Die Isoformen unterscheiden sich anhand der transmembranen Domäne. Diese ist von unterschiedlicher Länge und fehlt bei NCAM-120 ganz.

### 3.3.2 Modifikationen von NCAM

Neben den bereits erwähnten Modifikationen des NCAM-Gen-Produktes, die zu den Hauptisoformen führen, existieren noch eine Reihe weiterer translationaler und posttranslationaler Vorgänge, die unterschiedliche Molekülvarianten zur Folge haben. Hier wäre zunächst die Insertion des sogenannten an variabler Domäne alternativ gespleißten Exons (VASE) zu nennen. Die Fraktion des daraus entstehenden NCAM-Typs nimmt während der Entwicklung hin zum erwachsenen Individuum zu und hat einen inhibitorischen Effekt auf das Axonwachstum. Bei der Glykolysierung mit Polysialic Acid (PSA) handelt es sich um eine posttranslationale Modifikation, deren Produkt auch als embryonic NCAM (eNCAM) bezeichnet wird. Der im embryonalen Hirn 30% ausmachende Gewichtsanteil von PSA am gesamten NCAM-Molekül sinkt bis auf 10% im adulten Hirn. PSA-NCAM scheint eine besondere Rolle für die Hirnentwicklung und neuronale Plastizität zuzukommen (Rønn et al. 1998, Crossin und Krushel 2000). Im ausgewachsenen Hirn ist es lediglich in umschriebenen Regionen mit hoher struktureller Plastizität wie dem Hippocampus zu finden (Rønn et al. 1998, Walmod et al. 2004).

### 3.3.3 Funktionsweise und Bedeutung von NCAM

Die Grundlage der Funktionen von NCAM ist die Ausbildung homophiler Bindungen zu anderen NCAM-Molekülen bzw. heterophiler Bindungen zu Liganden wie den Adhäsionsmolekülen L1 und TAG-1, dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (FGFR), Adenosintriphosphat (ATP) sowie Komponenten der extrazellulären Matrix wie Heparin, verschiedenen Proteoglykanen und Kollagen (Walmod et al. 2004). Für die Bildung homophiler Bindungen werden verschiedene Modelle diskutiert. Aufgrund von Strukturanalysen der ersten

drei Ig-ähnlichen Domänen geht man aktuell von einem zweidimensionalen „compact-flat-zipper“-Modell aus, das die gleichzeitige Interaktion mehrerer NCAM-Moleküle beinhaltet (Kiselyov et al. 2005, Soroka et al. 2008). Dabei entstehen durch cis-Interaktionen NCAM-Dimere, die mit NCAM-Dimeren einer gegenüberliegenden Zelloberfläche zwei unterschiedliche trans-Interaktionen in Kombination eingehen (Soroka et al. 2003, Soroka et al. 2008). Inwiefern auch Ig4 und Ig5 entsprechend früher postulierter Modelle (Ranheim et al. 1996) an diesen Interaktionen durch räumliche Nähe zu Ig1 und Ig2 eines anderen NCAM-Dimers beteiligt sind, gilt es noch weiter auf struktureller Basis zu analysieren (Kiselyov et al. 2005).

Eine besondere Konstellation scheint sich für PSA-NCAM zu ergeben. Durch die Glykolysierung an Ig5 wird aufgrund des großen Volumens von PSA der Abstand zwischen den NCAM-Dimeren erheblich vergrößert, so dass sich bei der trans-Interaktion lediglich ein eindimensionaler Zipper ausbilden kann (Kiselyov et al. 2005). Hierdurch wird die resultierende Zelladhäsion schwächer, die Signaltransduktion jedoch gefördert (Crossin und Krushel 2000, Kiselyov et al. 2005).

Die homophilen und heterophilen Bindungen, die sich auch gegenseitig beeinflussen können, dienen also nicht nur der Zelladhäsion, sondern können auch zu einer Signaltransduktion führen, die Veränderungen in der Expression von Genen hervorruft (Rønn et al. 1998, Crossin und Krushel 2000, Nielsen et al. 2008). Somit entsteht ein Einfluss auf die Migration, Differenzierung und Proliferation von Neuronen und Gliazellen (Walmod et al. 2004). Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass NCAM die Proliferation von Astrozyten in vitro und in vivo verhindert und die Differenzierung neuraler Stammzellen zu Neuronen steigerte, während ihre Proliferation abnahm (Sporns et al. 1995, Krushel et al. 1995, Krushel et al. 1998, Amoreux et al. 2000, Shin et al. 2002). NCAM ist weiterhin auch bei der Regeneration von verletztem Nervengewebe bedeutsam (Kiss 1998, Crossin und Krushel 2000).

Eine weitere wichtige Aufgabe wird vor allem durch das PSA-NCAM übernommen. Durch die reduzierte Zelladhäsion fördert es das Wachstum, die Verzweigung und die Synapsenbildung von Axonen. Somit besteht neben einer besonderen regulatorischen Bedeutung in der Embryonalphase ein Einfluss auf das Lernen und die Ausbildung des Langzeitgedächtnisses (Rønn et al. 1998).

### **3.3.4 NCAM-Expression in Gliomen**

Verschiedene Arbeiten belegen, dass Astrozytome NCAM mit steigendem WHO-Grad vermindert exprimieren. Ohne weitere Zuordnung der Isoformen von NCAM findet sich diese

Aussage bei Huang et al. (Huang et al. 2001). Die Arbeitsgruppe um Sasaki zeigte dieses Ergebnis dagegen getrennt für alle drei Hauptisoformen von NCAM, Todaro et al. für die Isoformen NCAM-140 und NCAM-180 (Sasaki et al. 1998, Todaro et al. 2007).

Die tumorbiologische Wirkung einer herabgesetzten NCAM-Expression beinhaltet im Falle von NCAM-140 eine erhöhte Zellmotilität (Edvardsen et al. 1993, Prag et al. 2002). Gleichzeitig besteht eine Assoziation zwischen einer verminderten NCAM-Expression und einer gesteigerten Migration. Gratsa et al. belegen dies ohne weitere Differenzierung der NCAM-Isoformen, Owens et al. für NCAM-140 (Gratsa et al. 1997, Owens et al. 1998). Außerdem hängt die Expressionsminderung von NCAM-140 mit gesteigerter Invasion sowie erhöhten Wachstumsraten zusammen (Edvardsen et al. 1994, Owens et al. 1998).

### **3.3.5 Untersuchungen der neurochirurgischen Klinik Jena zur NCAM-140-Expression**

An der Klinik für Neurochirurgie der FSU Jena wurde die Expression von NCAM-140 in zwei vorangegangenen Arbeiten untersucht.

Die Diplomarbeit von Koblitz zeigt einen reziproken Zusammenhang zwischen der NCAM-140-Expression und dem WHO-Grad von Gliomen anhand von 37 Gliompräparaten (Koblitz 2005). Dieser Zusammenhang wird in der Dissertation von Dünisch anhand von 115 Gliomen bestätigt. Von den untersuchten 11 Glioblastomen bei Koblitz bzw. 48 Glioblastomen bei Dünisch waren jeweils 80% NCAM-140-negativ. Die graue Substanz tumorfreier Autopsieproben zeigte in beiden Arbeiten die höchste NCAM-140-Expression der erfassten Proben (Koblitz 2005, Dünisch 2008).

Außerdem konnten die NCAM-140-negativen Gliome sowohl in der Arbeit von Koblitz als auch in der Arbeit von Dünisch deutlich vom peritumoralen Hirngewebe abgegrenzt werden (Koblitz 2005, Dünisch 2008). Lichtmikroskopisch wurde bei Koblitz eine Tumorgrenze in 9 der 11 Glioblastome beobachtet. In einigen Fällen waren sowohl eine diffuse Einzelzellinvasion als auch eine Invasion scharf abgegrenzter Tumorzellnester zu beobachten. Auch makroskopisch war eine Grenze zwischen den NCAM-140-negativen Glioblastomen und dem umgebenden peritumoralen Gewebe zu identifizieren (Koblitz 2005).

Bei Dünisch zeigte sich lichtmikroskopisch in 15 von 25 Glioblastomschnitten mit enthaltenem peritumoralem Gewebe eine diffuse Einzelzellinvasion. Scharf begrenzte Tumorzellnester konnten bei zwei Glioblastomen und eine relativ scharfe Tumorgrenze in 8 Fällen beobachtet werden. Die Möglichkeit einer makroskopischen Identifikation der Tumorgrenze zum umgebenden peritumoralen Gewebe wurde in der Arbeit von Dünisch bestätigt (Dünisch 2008).



### 3.4 Die Matrixmetalloproteinase 2

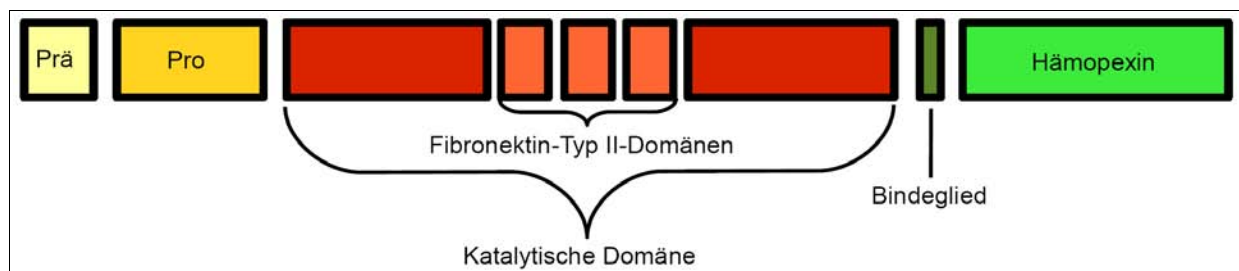
#### 3.4.1 Klassifikation und Aufbau der Matrixmetalloproteinasen

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) stellen eine Familie von über 20 Proteasen dar, in deren aktivem Zentrum sich ein Zinkatom befindet (Löffler und Petrides 2003). Entsprechend ihres Namens können sie in ihrer Gesamtheit alle bekannten Komponenten der extrazellulären Matrix abbauen bzw. proteolytisch spalten (McCawley und Matrisian 2000).

Aufgrund der Struktur ihrer substratbindenden Domäne werden fünf Untergruppen unterschieden: Kollagenasen, Gelatinasen (u.a. MMP-2), Stromelysine, Membrantyp-MMPs sowie zu sonstigen Subklassen gehörende MMPs (Komatsu et al. 2004).

Alle MMPs werden als Präproenzyme synthetisiert und bestehen aus verschiedenen Domänen mit variablen Motiven. Kern des Enzyms bildet die katalytische Domäne, die neben dem Zinkatom zwei bis drei für die Stabilität und enzymatische Aktivität benötigte  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen enthält. Außerdem sind bei den Gelatinasen drei Fibronectin-Typ-II-Domänen in diesen Bereich eingefügt (Nagase und Woessner 1999) (Abbildung 4).

Der katalytischen Domäne vorgeschaltet sind die Prädomäne, die das Signal zur extrazellulären Sekretion gibt, und die Prodomäne, welche das Enzym in einem inaktiven Status hält. Am C-terminalen Ende der katalytischen Domäne schließt sich meist eine Hämopectindomäne an, die zusätzliche Protein-Protein-Interaktionen mit Substraten und natürlichen Inhibitoren vermittelt (McCawley und Matrisian 2000). Bei MMP-2 wird sie für die Oberflächen-Aktivierung durch mt1-MMP benötigt (Nagase und Woessner 1999).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der verschiedenen Domänen von Gelatinasen** (modifiziert nach Nagase und Woessner 1999) Ein Vertreter der Gelatinasen ist MMP-2.

#### 3.4.2 Aktivierung und Funktion der Matrixmetalloproteinasen

Die Funktion der bereits transkriptionell in ihrer Expression regulierten MMPs steht unter der Kontrolle von Aktivatoren und Inhibitoren. Meist als inaktives Zymogen sezerniert, werden MMPs durch proteolytische Abspaltung der Prodomäne aktiviert (Nagase und Woessner 1999, Chintala et al. 1999). Im aktiven Zentrum kommt es zu einer Freilegung des Zinkatoms, welches zuvor mit einem Cysteinrest der Prodomäne komplexiert war (Cysteinswitch). Als Aktivatoren agieren in vivo vor allem Gewebe- oder Plasmaproteinase wie das System aus

Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivator (UPA) und Plasmin oder die membranständige Matrixmetalloproteinase mt1-MMP (Nagase und Woessner 1999). Natürliche Inhibitoren der MMPs stellen vor allem die sogenannten Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) dar, die normalerweise in einem fein regulierten Gleichgewicht zu den MMPs auftreten (Löffler und Petrides 2003).

Im Allgemeinen liegt die Expression von MMPs auf niedrigem Niveau und kann zu Zeiten aktiven Gewebeumbaus durch Faktoren wie Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren schnell induziert werden (Nagase und Woessner 1999, McCawley und Matrisian 2000). Physiologische Aufgaben erfüllen MMPs unter anderem bei der Ovulation, der Embryonalentwicklung, der postpartalen Uterusinvolution, dem Nervenwachstum, dem Knochenumbau, der Wundheilung, der Angiogenese und der Apoptose. Doch sind sie andererseits auch an zahlreichen pathologischen Prozessen wie Karzinomen, Arthritis, kardiovaskulären und neurologischen sowie fibrotischen Erkrankungen beteiligt (Nagase und Woessner 1999).

Die Funktionsweise der MMPs beinhaltet nicht nur den ungerichteten Abbau extrazellulärer Matrix. Durch gezielte Proteolyse können MMPs zur Aktivierung anderer MMPs führen. Außerdem haben sie das Potenzial, Zytokine, Wachstumsfaktoren, Rezeptoren und extrazelluläre Liganden mit entsprechenden nachfolgenden intrazellulären Signalkaskaden zu spalten (McCawley und Matrisian 2000, Du et al. 2008).

### **3.4.3 Tumorbiologische Bedeutung der Matrixmetalloproteinasen**

Vorgänge wie Angiogenese und Invasion, die für Tumore biologisch von grundlegender Bedeutung sind, bedürfen des kontrollierten Abbaus der extrazellulären Matrix (Béliveau et al. 1999). Dabei scheint es eine enge Beziehung zur Expression verschiedener Proteasen wie MMPs und Serinproteasen zu geben. Primär sind MMPs für die Degradierung der extrazellulären Matrix verantwortlich (Chintala et al. 1999). Sie werden von einer Vielzahl von Tumoren in verstärktem Maße exprimiert, darunter auch von Gliomen (Béliveau et al. 1999, Chintala et al. 1999, Nakada et al. 1999, Nakada et al. 2003). Eine inverse Korrelation zwischen WHO-Grad und TIMP-Expression verschiebt zusätzlich das Gleichgewicht von MMPs und Inhibitoren in Richtung Degradierung der Extrazellulärmatrix (Béliveau et al. 1999). Die MMP-Aktivität hat vermutlich zudem Effekte auf das Tumorwachstum. Ein beobachteter prognostischer Zusammenhang zwischen MMP-Spiegel und dem klinischen Outcome von Tumorpatienten betont, dass dieser Faktor auch von prognostischer Relevanz sein könnte (McCawley und Matrisian 2000).

### **3.4.4 Die Matrixmetalloproteinase 2 (MMP-2)**

Die Matrixmetalloproteinase-2 gehört zu den Gelatinasen und ist auch unter den synonymen Begriffen Gelatinase A bzw. 72kDa Typ IV Kollagenase bekannt (Chintala et al. 1999). Natürliche Substrate sind, wie die Namen andeuten, vor allem Gelatine und Kollagen Typ IV, welches die Hauptkomponente der Basalmembran von Hirngefäßen bildet (Komatsu et al. 2004, Kunishio et al. 2003). Verschiedene Eigenschaften geben der MMP-2 eine besondere Rolle innerhalb der MMPs, wozu unter anderem ihr Aktivierungsmechanismus gehört. Oft schon in einem Komplex mit dem endogenen Inhibitor TIMP-2 sezerniert, bildet sie zelloberflächengebunden mit mt1-MMP einen trimerischen Komplex. In diesem wird sie durch mt1-MMP stufenweise aktiviert (Strongin et al. 1995, Chintala et al. 1999, Nagase und Woessner 1999). Nachfolgend übernimmt MMP-2 sowohl in physiologischen als auch pathologischen Prozessen regulatorische Aufgaben im Zusammenhang mit Adhäsion, Zellproliferation und Migration (Deryugina et al. 1997, Chintala et al. 1999). Eine weitere Besonderheit ist die ubiquitäre Gewebeverteilung mit konstitutiver Expression in vielen Zellen. So findet man MMP-2 regelmäßig in erhöhtem Maße in Tumorzellen wie Kolonkarzinomen, Mammakarzinomen, aber auch in Gliomen (Chintala et al. 1999). Neben MMP-9 ist sie die am meisten detektierte MMP in Gliomen (Kunishio et al. 2003). Die Regulation des Enzyms scheint allerdings überwiegend posttranskriptional auf Ebene der Proenzymaktivierung stattzufinden (Chintala et al. 1999, Komatsu et al. 2004).

Glioblastome exprimieren MMP-2 in höherem Maße als niedriggradige Astrozytome (Sawaya et al. 1996, Nakada et al. 1999, Yano et al. 2001). Eine starke Gelatinaseaktivität wurde vor allem dort beobachtet, wo sich Pseudopalisaden befanden (Brat et al. 2004). Daneben wurde eine erhöhte Expression von MMP-2 vor allem in Endothelzellen beschrieben (Tews und Nissen 1998-1999).

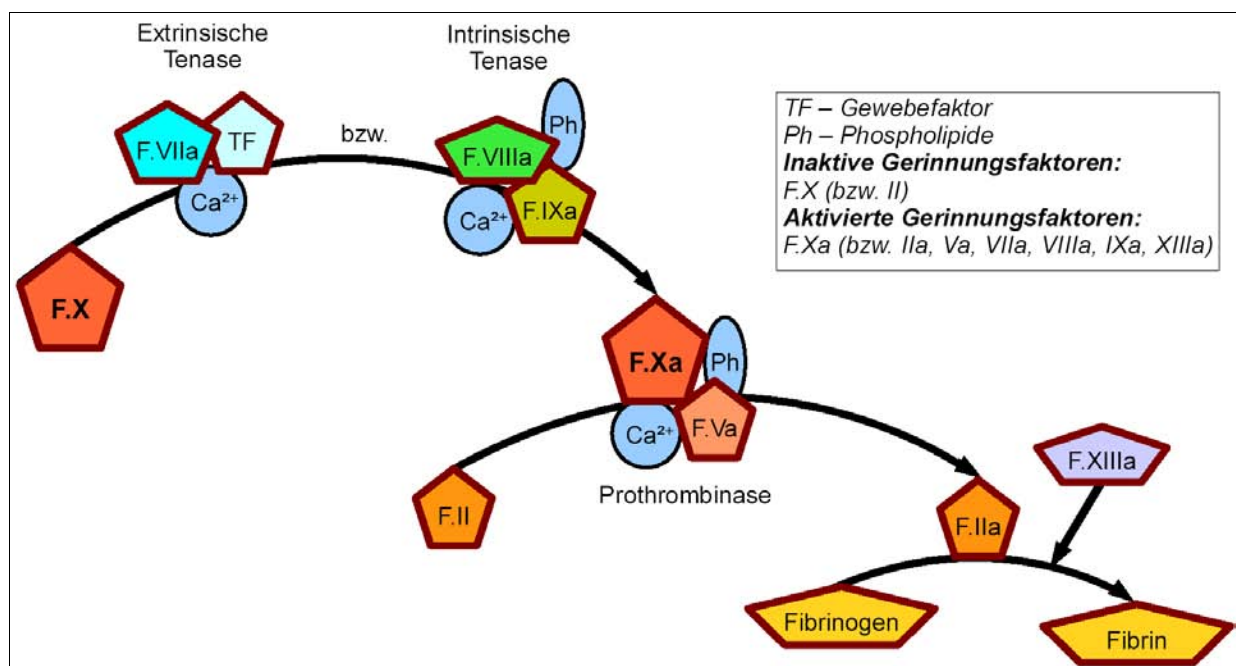
## **3.5. Der Gerinnungsfaktor X**

### **3.5.1 Struktur und klassische Funktion des Gerinnungsfaktors X**

Faktor X ist ein Vitamin-K-abhängiges Plasmaprotein, das zur Familie der Serinproteasen gehört (Borensztajn et al. 2007). Als inaktives Proenzym - physiologischer Weise in der Leber synthetisiert und posttranslational modifiziert - zirkuliert es als zweikettiges Zymogen im Kreislauf. Beide Ketten des 59kDa ausmachenden Faktor X werden durch eine Disulfidbrücke zusammengehalten. Aktiviert wird der Faktor X zu Faktor Xa durch eine proteolytische Spaltung unter der Freisetzung eines 52 Aminosäuren langen Peptides. Daraufhin ist das katalytische Zentrum mit der katalytischen Triade aus Serin, Histidin und Asparaginsäure

bereit, den Gerinnungsfaktor II (Prothrombin) als natürliches Substrat umzusetzen (Linnemann und Kühl 2002).

In der Gerinnungskaskade verläuft die gemeinsame Endstrecke des intra- und extravaskulären Systems über den Faktor X. Erstgenannter Weg trägt seinen Namen, da für dessen Aktivierung ausschließlich im Blut vorhandene Faktoren zum Tragen kommen, obgleich er über eine Querverbindung auch durch den extrinsischen Weg aktiviert werden kann (Löffler und Petrides 2003, Borensztajn et al. 2008). So wird Faktor X durch die intrinsische Tenase aktiviert, einem Komplex aus Faktor IXa, Faktor VIIIa,  $\text{Ca}^{2+}$  und Phospholipiden. Hauptaktivator des Faktor X ist jedoch die extrinsische Tenase, ein Komplex des extrinsischen Gerinnungsweges aus Gewebefaktor, Faktor VIIa und  $\text{Ca}^{2+}$ . Faktor Xa bildet nun unabhängig vom Aktivierungsweg mit Faktor Va,  $\text{Ca}^{2+}$  und Phospholipiden den Prothrombinasekomplex, der eine Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin bewirkt. Thrombin vermag Fibrinogen in Fibrin umzuwandeln. Unter dem Einfluss von Faktor XIII werden schließlich Fibrinmonomere zu einem stabilen Polymer zusammengesetzt (Linnemann und Kühl 2002) (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Gerinnungskaskade** (modifiziert nach Linnemann und Kühl 2002)  
Faktor X wird durch die extrinsische oder intrinsische Tenase aktiviert und wandelt als Teil des Prothrombinasekomplexes Prothrombin (Faktor II) in Thrombin (Faktor IIa) um.

Neben der primären katalytischen Wirkung kommt Faktor Xa eine Rückkopplungsfunktion zu, indem er seine eigene Proteolyse über die Aktivierung des Faktor VII verstärkt und daneben Faktor Va vor dem Abbau schützt.

Das gesamte Gerinnungssystem stellt ein fein reguliertes Gleichgewicht aus pro- und antikoagulatorischen Faktoren dar. Letztere haben verschiedene Angriffspunkte. Faktor Xa

selbst wird durch Antithrombin gehemmt und verliert durch die Anwesenheit des Protein S seine protektive Wirkung für Faktor Va (Linnemann und Kühl 2002).

### **3.5.2 Tumorbiologische Bedeutung prokoagulatorischer Veränderungen**

Zwischen Malignität und abnormaler Gerinnung besteht ein gesicherter starker Zusammenhang (Brat et al. 2004). So wurden bei Glioblastomen in 90% der Fälle intravaskuläre Thrombosen innerhalb des Tumors beobachtet. Doch auch eine systemische Koagulationsstörung zeigt sich bei diesen Patienten (Rong et al. 2005). Neben erhöhter Fibrinolyse sind verminderte Fibrinogenspiegel sowie verminderte Spiegel von Faktor II, V und VII zu beobachten. Da es bei 20 – 30% der Patienten zu einer tiefen Venenthrombose der unteren Extremitäten kommt, lassen die koagulatorischen Veränderungen am ehesten eine Form chronischer disseminierter intravasaler Gerinnung vermuten (Sawaya und Glass-Greenwalt 1992, Rong et al. 2005).

Über den Mechanismus der Pseudopalisadenbildung scheint das prokoagulatorische Verhalten tumorbiologisch von Vorteil zu sein. Durch unterschiedliche Formen von Gefäßveränderungen, unter denen Thrombosen relevant erscheinen, kommt es initial zu einer lokalen Hypoxie. Daraufhin diffundieren Tumorzellen vom hypoxischen Zentrum weg, während die übrig gebliebenen Tumorzellen nekrotisch werden. Es entsteht das für Glioblastome typische Bild zentraler Nekrosen mit umgebenden Pseudopalisaden. Letztere produzieren aufgrund des hypoxischen Milieus den hypoxieinduzierbaren Faktor (HIF), der zur Bildung der proangiogenetischen Faktoren VEGF und IL-8 führt (Brat et al. 2004). In Regionen peripher der Hypoxie entstehen unter dem Einfluss vermehrter Expression von VEGF-Rezeptoren auf Endothelzellen der Glioblastome mikrovaskuläre Prolifere (Brat et al. 2004).

Unter den Umständen erhöhter Thrombosierungsraten werden also die Neoangiogenese gefördert und zum Aufbau einer weniger wirtsabhängigen Gefäßversorgung fähige, gut migrierende Tumorzellpopulationen selektiert. Dies fördert eine starke neoplastische Expansion in die Peripherie (Brat et al. 2004).

### **3.5.3 Koagulationsunabhängige Wirkungen des Faktor X**

Gerinnungsfaktoren haben aufgrund ihrer proteolytischen Eigenschaften nicht nur koagulationsfördernde Fähigkeiten, sondern können auch über proteaseaktivierte Rezeptoren (PARs) Einfluss auf physiologische und pathophysiologische Vorgänge nehmen (Ossovsкая und Bunnett 2004). Durch eine enzymatische Spaltung der Rezeptoren kommt es zu unterschiedlichen intrazellulären Reaktionskaskaden (Borensztajn et al. 2008).

Von den bisher vier charakterisierten PARs kann Faktor Xa prinzipiell PAR-1, PAR-2 und PAR-4 aktivieren, seine Bedeutung in Bezug auf letzteren Rezeptor ist bisher jedoch nicht ausreichend geklärt (Camerer et al. 2000). Faktor Xa agiert entweder allein oder als Teil des Komplexes aus Gewebefaktor, Faktor VIIa und Faktor Xa. Dieser Komplex vermag nur den von Faktor Xa bevorzugten Rezeptor PAR-2 zu aktivieren (Borensztajn et al. 2008).

Das Verteilungsmuster der PARs ist gewebespezifisch und beeinflusst neben dem Zelltyp, der Aktivierungsstärke des Rezeptors und der aktivierenden Protease die hervorgerufene zelluläre Reaktion (Ossovskaya und Bunnett 2004, Borensztajn et al. 2008). Die nach bisherigem Kenntnisstand am weitesten verbreiteten PARs PAR-1 und PAR-2 werden unter anderem von Endothelzellen und Neuronen, aber auch von Gliomzellen exprimiert (Kaufmann et al. 1998, Okamoto et al. 2001, Ossovskaya und Bunnett 2004). Für Astrozyten, die nicht pathologisch verändert sind, wurde das Vorhandensein aller vier PAR-Typen nachgewiesen (Wang et al. 2002).

Die Reaktionen der über PARs aktivierten Zellen reichen von Zellwachstum und Differenzierung über Migration bis hin zu Zellüberleben, Entzündung und Schmerz. In Astrozyten bewirken beispielsweise PAR-1-Agonisten eine Kontrolle von Zellform und Migration über das aktinbasierte Zytoskelett. Sie induzieren die Proliferation von Astrozyten, in höheren Konzentrationen können sie aber auch ihre Apoptose verursachen (Ossovskaya und Bunnett 2004, Borensztajn et al. 2008).

Auch scheinen PARs eine wichtige tumorbiologische Rolle zu spielen: Karzinomzellen befinden sich meist in einer proteasereichen Mikroumgebung und besitzen oft selbst PARs. Deren Aktivierung bewirkt Veränderungen zugunsten zellulärer Invasion, Degradierung extrazellulärer Matrix, Gewebeumbau und Angiogenese. So fördern beispielsweise PAR-2-Agonisten die Proliferation von Endothelzellen (Ossovskaya und Bunnett 2004).

In vivo wird die Relevanz von PARs dadurch erhöht, dass die Expression von Proteasen wie Faktor X in verschiedensten Gewebetypen über den physiologischen Hauptsyntheseort hinaus beobachtet wurde (Yamada 1996).

#### **4 Ziele der Arbeit**

Glioblastome zeichnen sich unter anderem durch zentrale Nekrosen und periphere Tumorzellinvasion in das umliegende Hirngewebe aus (Kleihues und Cavenee 2000). Dieses Verhalten von Tumorzone und Invasionszone lässt verschiedene tumorbiologische Vorgänge und molekulare Ausstattungen in den beiden Arealen vermuten. Darüber hinaus lässt die starke Zellinvasion so gut wie nie eine klare Tumorgrenze erkennen.

In vorausgegangenen Arbeiten der Klinik für Neurochirurgie Jena ist es gelungen, bei der Untersuchung von Glioblastomen vielfach eine deutliche Abgrenzung des Tumors zum peritumoralen Hirngewebe anhand der NCAM-140-Expression zu identifizieren. Somit wird eine Unterscheidung von Tumorzone und Invasionszone über das Kriterium histomorphologischer Charakteristika hinaus ermöglicht.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, inwiefern die beschriebene Identifikation einer Tumorgrenze aufgrund der NCAM-140-Expression reproduzierbar ist und durch weitere biologische Faktoren charakterisiert wird. Zunächst sollen Glioblastompräparate ermittelt werden, die neben dem Tumorgewebe auch peritumorales Hirngewebe im Sinne einer Invasionszone enthalten.

Anschließend soll makroskopisch und lichtmikroskopisch untersucht werden, in welchem Umfang Zellen der Tumorzone und der Invasionszone NCAM-140 exprimieren. Weiterhin soll die Darstellbarkeit einer scheinbaren Grenze zwischen Tumorzone und Invasionszone anhand der NCAM-140-Immunreaktivität beurteilt und genauer charakterisiert werden.

Darauf aufbauend soll die Expression von MMP-2, die ein Invasionsfaktor sein kann, in der Tumorzone und der Invasionszone getrennt beurteilt und miteinander verglichen werden. Das Vorhandensein des Proteins soll semiquantitativ analysiert und seine Lokalisation im Tumor bestimmt werden. In analoger Weise wird eine Expressionsanalyse für den Gerinnungsfaktor X durchgeführt, für den die Funktion eines Wachstumsfaktors angenommen wird.

Die Auswertung der Antigenexpression von MMP-2 und Faktor X erfolgt lichtmikroskopisch unter einer Differenzierung verschiedener Gewebeanteile. Im Einzelnen sind dies die Tumorzone und die Invasionszone. Daneben sollen Zellen der Pseudopalisaden sowie Blutgefäße untersucht werden. Für die Tumorzone und die Invasionszone werden die Daten getrennt erfasst und letztlich einer statistischen Bewertung zugeführt.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Materialien und Geräte

#### 5.1.1 Gewebeproben

Für die Untersuchung wurden alle verfügbaren Glioblastompräparate der Jahre 1997 bis 2005 des Pathologischen Instituts des Universitätsklinikums Jena verwendet. Es handelte sich dabei um insgesamt 52 Glioblastomproben aus Operationsmaterial, von denen 43 Proben eine sichtbare Grenze zum peritumoralen Hirngewebe beinhalteten. Laut Pathologieberichten lag in allen Fällen ein primäres Glioblastom vor. Als Referenz wurden 20 Proben tumorfreier grauer und weißer Hirnsubstanz des Telenzephalon aus Sektionsmaterial genutzt.

Ein Antrag zur Untersuchung dieser Gewebe wurde bei der Ethikkommission gestellt und bewilligt.

#### 5.1.2 Geräte für die histopathologische Untersuchung

In der folgenden Tabelle 3 sind die für die histopathologische Untersuchung verwendeten Geräte aufgeführt.

**Tabelle 3: Geräte für die histopathologische Untersuchung**

Gerät	Firma	Herstellungsort
Mikrotom HM 335 E	Microm GmbH	Walldorf, Deutschland
Wasserbad Typ 1052	Gesellschaft für Labortechnik mbH	Burgwedel, Deutschland
Hitzeschrank Typ 54010	Medax Nagel GmbH	Kiel, Deutschland
Inkubator Kelvitront®	Heraeus Instruments	Hanau, Deutschland
Reinwasseranlage „PURELAB maxima“	ELGA Lab Water	Ransbach-Baumbach, Deutschland
Analysenwaage	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Vortex-Genie 2™	Scientific Industries	Bohema, USA
Zentrifuge „5415 C“	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
1000µl, 200µl, 2-20µl, 0,5-10µl Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Rotilabo®-Färbekammer	Carl Roth GmbH&Co KG	Karlsruhe, Deutschland
Färbekasten aus Glas	A. Hartenstein GmbH	Würzburg, Deutschland
Glasschale	A. Hartenstein GmbH	Würzburg, Deutschland
Messzylinder 2l	A. Hartenstein GmbH	Würzburg, Deutschland
Lichtmikroskop DME	Leica Microsystems Ltd.	Buffalo, N.Y., USA
Kamera DFC 290	Leica Microsystems Ltd.	Buffalo, N.Y., USA



### 5.1.3 Materialien für die histopathologische Untersuchung

Tabelle 4 gibt eine Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.

**Tabelle 4: Materialien für die histopathologische Untersuchung**

Materialname	Firma	Herstellungsort
<b>Verbrauchsmaterialien</b>		
Superfrost® Color Objektträger, gebrauchsfertig	Menzel-Gläser®	Braunschweig, Deutschland
Polysine® Objektträger, gebrauchsfertig	Menzel-Gläser®	Braunschweig, Deutschland
Deckgläser, 24x50mm bzw. 24x32mm	Menzel-Gläser®	Braunschweig, Deutschland
Bearbeitungsklingen für Mikrotom	FEATHER® Safety Razor Co., Ltd.	Osaka, Japan
Pinzel	Pelikan®	Hannover, Deutschland
Eppendorf Tubes	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
<b>Fixier- und Einbettmittel</b>		
Formaldehyd	Carl Roth GmbH&Co KG	Karlsruhe, Deutschland
Paraffin	Carl Roth GmbH&Co KG	Karlsruhe, Deutschland
<b>Lösungsmittel</b>		
Aceton, reinst	Carl Roth GmbH&Co KG	Karlsruhe, Deutschland
Xylol, reinst	Carl Roth GmbH&Co KG	Karlsruhe, Deutschland
Ethanol (50-, 70-, 96-%)	Carl Roth GmbH&Co KG	Karlsruhe, Deutschland
<b>Puffersubstanzen</b>		
TRIZMA® Base	SIGMA®-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
TRIZMA® Hydrochlorid	SIGMA®-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
NaCl, reinst	E. Merck	Darmstadt, Deutschland
TWEEN 20	SIGMA®-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
<b>Spezielle Chemikalien für die Immunhistochemie</b>		
ChemMate™ Detection Kit - Biotinylierter Sekundärantikörper - Streptavidin-Alkalische Phosphatase - Chromogen Rot 1 (x28) - Chromogen Rot 2 (x28) - Chromogen Rot 3 (x28) - AB Substrat Puffer - Levamisol (x501)	Dako Cytomation	Glostrup, Dänemark
Antikörpervedünnungslösung	Zymed	San Francisco, USA
<b>Verwendete Antikörper</b>		
Kaninchen Anti-Human-NCAM-140 polyklonaler Primärantikörper (CD 56)	Chemicon International®	Temecula, USA
Maus Anti-Human-MMP-2 monoklonaler Primärantikörper (72kDa Kollagenase/ Gelatinase A)	Chemicon International®	Temecula, USA
Kaninchen Anti-Human-Faktor X polyklonaler Primärantikörper (H-120)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Santa Cruz, USA
<b>Färbelösungen</b>		
Eosin Y Lösung, alkoholisch	SIGMA®-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Hämatoxylin-Lösung	SIGMA®-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
<b>Eindeckmittel</b>		
Glycerol-Gelatine (für Mikroskopie), gebrauchsfertig	SERVA	Heidelberg, Deutschland
Pertex™ Eindeckmittel	Medite® GmbH	Burgdorf, Deutschland

### 5.1.4 Zusammensetzung der Lösungen und Puffer

Die folgenden Tabellen 5 und 6 geben die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer wider.

**Tabelle 5: Zusammensetzung des TRIS-Puffers**

Substanz	Menge
TRIZMA® Base	2,3g
TRIZMA® Hydrochlorid	17,13g
NaCl, reinst	22g
TWEEN 20	2,5ml
Aqua bidest.	2,5l

**Tabelle 6: Zusammensetzung der Primärantikörperlösung**

Primärantikörper	Verhältnis der Verdünnung mit Antikörperverdünnungslösung
NCAM-140	1:1000
MMP-2	1:500
Faktor X	1:250

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 Herstellung der Präparate

Nach der operativen Entfernung der Glioblastome erfolgte die Fixierung mit Formaldehyd für maximal 24 Stunden bei Raumtemperatur. Dieses diente der Unterbrechung mikrobieller und autolytischer Prozesse und damit dem Erhalt der ursprünglichen Gewebemorphologie im Zustand zum Entfernungszeitpunkt (Welsch 2006). Im Anschluss an die chemische Fixierung wurden die Gewebeproben in Paraffin eingebettet.

Mit dem Mikrotom wurden im folgenden Arbeitsschritt pro geplanter Färbung je zwei 6µm dicke Schnitte des humanen Glioblastomgewebes bzw. der Proben aus Sektionsmaterial angefertigt und in einem Wasserbad bei Raumtemperatur aufgefangen. In einem zweiten Wasserbad bei 50°C wurden sie anschließend gestreckt und möglichst faltenfrei auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Nach einem Trocknungsprozess von 24h bei 37°C wurden die Präparate zur optimalen Haftung auf den Objektträgern für weitere 30 Minuten bei 60°C inkubiert.

### 5.2.2 Entparaffinierung und Rehydrierung für die Immunhistochemie

Damit die Immundetektion erfolgreich durchgeführt werden konnte, musste das Gewebe zunächst entparaffiniert und rehydriert werden. Um ersteres zu erreichen, erfolgte eine 20-minütige Inkubation der Präparate in Küvetten mit reinem Xylol. Die Rehydrierung ins

wässrige Milieu wurde danach über eine absteigende Acetonreihe erreicht. Anschließend wurde zu den Präparaten 0,1%iger TWEEN 20/TRIS-Puffer zur Equilibrierung gegeben.

### **5.2.3 Entparaffinierung und Rehydrierung für die Hämatoxylin-Eosin (H/E)-Färbung**

Nach einer wie im vorherigen Punkt beschriebenen Entparaffinierung erfolgte die Rehydrierung des Gewebes über eine absteigende Ethanolreihe mit 96%-igem, 70%-igem und 50%-igem Ethanol.

### **5.2.4 Immunhistochemische Methode**

Die vorbereiteten Präparate wurden nun in horizontale Färbekammern gelegt. Von der aus Primärantikörper und Antikörperverdünnungslösung hergestellten Primärantikörperlösung (Tabelle 6) wurden jeweils 200µl zügig auf die Objektträger aufgetragen. Bei 4°C wurden die Gewebeschnitte für 20 Stunden mit dem Antikörper inkubiert und danach durch 20-minütiges Waschen mit 0,1%igem TWEEN 20/ TRIS-Puffer von ungebundenem und überschüssigem Primärantikörper befreit.

### **5.2.5 Nachweis des gebundenen Primärantikörpers mittels Immundetektion**

Die verwendeten primären Antikörper besitzen zunächst keine Markierung und mussten nach der Reaktion mit dem Antigen mit Hilfe eines Immundetektionskits sichtbar gemacht werden. Hierzu wurde der ChemMate™ Detection Kit genutzt, der nicht nur eine Visualisierung, sondern zudem eine Verstärkung des Signals ermöglicht und eine erhöhte Sensitivität besitzt. Das Prinzip des Kits basiert auf einer indirekten Streptavidin-Biotin-Methode (Dako Cytomation 1999).

Für die folgenden Arbeitsschritte wurden die Präparate erneut in horizontale Färbekammern überführt und mit jeweils 3 Tropfen biotinyliertem Sekundärantikörper benetzt. Dieser ist mit einem Spacerarm ausgestattet, auf dem sich zur Signalverstärkung jeweils sieben Biotinmoleküle befinden (Dako Cytomation 1999). Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur folgte ein zehnminütiger Waschvorgang mit 0,1%-igem TWEEN 20/ TRIS-Puffer. Danach wurden die Objektträger ein weiteres Mal in die Färbekammern gelegt, je 3 Tropfen Streptavidin-konjugierte alkalische Phosphatase darauf gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Aufgrund der hohen Affinität zwischen Streptavidin und Biotin und dem Vorhandensein des biotinylierten Spacerarms kam es während dieses Vorgangs zu einer Bindung mehrerer Streptavidinmoleküle an jeden Sekundärantikörper (Dako Cytomation 1999). Im Anschluss an einen weiteren Waschvorgang von 10 Minuten wurden die

Gewebeschnitte in die Färbekammern zurückgelegt und mit je 200µl der nach Vorgaben des Benutzerhandbuchs vorbereiteten Farbsubstratlösung für fünf Minuten bzw. 7 Minuten im Falle des Faktor-X-Nachweises inkubiert. Das zunächst blassgelbe Chromogensubstrat wurde in dieser Zeit durch die alkalische Phosphatase zu einem roten unlöslichen Reaktionsprodukt umgewandelt. Die Aktivität der endogenen alkalischen Phosphatase wurde durch Levamisol, einem Bestandteil der Farbsubstratlösung, gehemmt (Dako Cytomation 1999).

Diese Reaktion wurde schließlich durch eine erneute Überführung und Spülung in dem 0,1%-igen TWEEN 20/ TRIS-Puffer unterbrochen.

### **5.2.6 Gegenfärbung mit Hämatoxylin**

Zur Sichtbarmachung der Zellkerne wurden die Präparate am Ende schließlich noch mit Hämatoxylin gegengefärbt. Dieser positiv geladene Farbstoff bindet an die negativ geladenen Nukleinsäuren der Zellkerne und lässt diese dadurch blau erscheinen (Welsch 2006).

Hierzu wurden die Präparate der Pufferlösung entnommen und zehnmalig mit Leitungswasser gewaschen. Danach wurden die Objektträger zweimal mit zweifach destilliertem Wasser gewaschen, bevor Hämatoxylin für eine Minute bzw. anderthalb Minuten im Falle der Färbung gegen Faktor X bei Raumtemperatur in die Küvetten zu den Schnitten gegeben wurde. Anschließend wurde wiederum zweimal mit zweifach destilliertem Wasser gespült, um überschüssiges Hämatoxylin vor dem eigentlichen Bläuen zu entfernen. Dann wurde für zehn Minuten Leitungswasser zur Farbentwicklung zugegeben.

Zur Fertigstellung wurden die Präparate schließlich mit Glycerol-Gelatine und Deckgläsern eingedeckt und für 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

### **5.2.7 Hämatoxylin/Eosin-Färbung**

Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung wurden die Präparate einmalig mit Leitungswasser und zweimalig mit zweifach destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurde Hämatoxylin für 7 Minuten hinzugefügt und die Schnitte danach mit destilliertem Wasser gespült. Die Farbentwicklung erfolgte schließlich auch hier für zehn Minuten in Leitungswasser.

Nach einer Spülung mit destilliertem Wasser wurde Eosin für zwei Minuten zu den Schnitten gegeben. Danach wurden die Präparate mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und zum Abschluss zweimal mit Xylol gespült. Anschließend wurden die Präparate mit einem xylolhaltigen Eindeckmittel und Deckgläsern eingedeckt.

### **5.3 Auswertungsmethoden**

Die makroskopische und lichtmikroskopische Auswertung erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher (S. Kellmann, Dr. med. S. Kuhn). Die Tumorbereiche auf den H/E-Schnitten wurden von Dr. med. M. Brodhun eingezeichnet und auf alle anderen Präparate übertragen.

#### **5.3.1 Markierung von Tumorzone und Invasionszone**

In der Immunhistochemie spiegelt die Färbung die Proteinexpression wider und lässt anhand ihrer Intensität nicht nur Rückschlüsse auf das qualitative, sondern auch auf das quantitative Vorhandensein und die Lokalisation von Proteinen zu. Die überwiegend NCAM-140-negativen Glioblastome sind vom meist NCAM-140-positiven peritumoralen Hirngewebe anhand einer solchen Immundetektion teilweise relativ scharf abgrenzbar. Es ist aber bekannt, dass aufgrund des diffus infiltrativen Wachstums von Glioblastomen prinzipiell nicht von einer Grenze des Tumors gesprochen werden kann. Unter Berücksichtigung dieses Aspektes soll im folgenden die Linie des Umschlages von NCAM-140-Negativität zu NCAM-140-Positivität als Tumorgrenze bezeichnet werden.

Für die Charakterisierung dieser Tumorgrenze und die weiteren Untersuchungen wurden die Tumorzone und die Invasionszone auf den H/E-gefärbten Präparaten markiert und auf die gegen NCAM, MMP-2 bzw. Faktor X gefärbten Präparate übertragen.

#### **5.3.2 Makroskopie**

Für die gegen NCAM-140 gefärbten Tumorpräparate wurde zunächst eine makroskopische Betrachtung durchgeführt. Hierzu wurde die mit bloßem Auge wahrnehmbare Immunreaktivität von NCAM-140 für die Tumorzone und die Invasionszone getrennt untersucht.

Die im untersuchten Areal maximal sichtbare Intensität der Rotfärbung wurde im ersten Schritt anhand einer vierstufigen Skala subjektiv bewertet. Dabei entsprach der Zahlenwert 0 einer negativen Immunreaktivität. Eine 1 beschrieb eine schwach positive Antigenexpression. Eine moderat positive Immunreaktivität des Gewebes wurde mit einer 2 charakterisiert, eine stark positive mit dem Wert 3 (Tabelle 7). Anschließend wurde der Flächenanteil mit dieser Farbintensität an der gesamten untersuchten Fläche geschätzt und einer von fünf Gruppen zugeordnet (1-25%, 26-50%, 51-75%, 76-99% oder 100%) (Tabelle 8). Lagen verschiedene Farbintensitäten innerhalb des bewerteten Bereiches vor, so wurde der Vorgang für alle weiteren Farbintensitäten entsprechend wiederholt.

**Tabellen 7 und 8: Darstellung des verwendeten Auswertungsschemas**

Bewertet wurde sowohl die Farbintensität der Immunreaktion als auch der Anteil positiver Zellen.

Farbintensität	Wert für die Intensität	Flächenanteil bzw. Anteil exprimierender Zellen jeweiliger Farbintensität pro Gesichtsfeld in %	Mittelwert in %
Negativ	0	1-25	13
Schwach	1	26-50	38
Moderat	2	51-75	63
Stark	3	76-99	87,5
		100	100

**5.3.3 Lichtmikroskopie**

Für alle Referenz- und Tumorproben lagen für jede Färbung zwei Gewebeschnitte vor. In jedem Glioblastompräparat wurden jeweils zehn verschiedene Gesichtsfelder der Tumorzone und der Invasionszone zufällig ausgewählt und unter dem Lichtmikroskop bei 400facher Vergrößerung analysiert. Die Auswertung erfolgte subjektiv und ähnlich der makroskopischen Bewertung. In jedem untersuchten Gesichtsfeld wurde zunächst die maximal sichtbare Farbintensität mit einem Zahlenwert als negativ, schwach, moderat oder stark positiv bewertet (Tabelle 7). Anschließend wurde der Anteil von Zellen mit dieser Farbintensität an den gesamten Zellen des untersuchten Gesichtsfeldes geschätzt und einer der in Tabelle 8 erwähnten Gruppen zugeordnet. Lagen in diesem Gesichtsfeld noch weitere Farbintensitäten vor, so wurde der Vorgang für diese analog durchgeführt. Bei den Referenzproben wurden jeweils zehn zufällige Gesichtsfelder der grauen bzw. der weißen Substanz untersucht. Die Analyse der Gesichtsfelder entsprach der eben beschriebenen Methode.

In den gegen MMP-2 und Faktor X gefärbten Präparaten wurden verschiedene Gewebeanteile innerhalb von Tumorzone und Invasionszone getrennt analysiert. In der Tumorzone handelte es sich dabei um Zellen der Pseudopalisaden, mehrschichtige Blutgefäße und einschichtige Blutgefäße. Alle Zellen der Tumorzone, die nicht diesen drei Gewebeanteilen angehörten, wurden in einer weiteren Gruppe zusammengefasst. Diese wird im folgenden als „Tumorzone“ bezeichnet. In der Invasionszone wurden das eigentliche Gewebe sowie mehrschichtige und einschichtige Blutgefäße betrachtet.

Auch bei den gegen MMP-2 und Faktor X gefärbten Referenzproben erfolgte neben der getrennten Untersuchung der grauen und weißen Substanz eine Bewertung der mehrschichtigen und der einschichtigen Gefäße.

Entsprechend der bereits beschriebenen Methode wurden alle Gewebeanteile in jeweils zehn Gesichtsfeldern jedes Präparates untersucht.

Weiterhin wurde in den gegen NCAM-140 gefärbten Glioblastompräparaten der Übergang zwischen Tumorzone und Invasionszone untersucht. Es wurde bestimmt, ob eine diffuse

Einzelzellinvasion, eine diffuse Invasion von Tumorzellnestern, eine scharfe Tumorgrenze oder eine Übergangsform zwischen den verschiedenen Varianten zu sehen war.

Außerdem wurden für die verschiedenen Gewebeanteile und die unterschiedlichen Färbungen repräsentative Areale ausgewählt und fotografisch festgehalten. Die Zuordnung eines Messbalkens in den fotografischen Abbildungen erfolgte mit dem Programm Leica Application Suite 3.0.0.

### 5.3.4 Statistische Auswertung

Die gewonnenen Daten wurden für die statistische Auswertung im Programm SPSS 15.0 für Windows erfasst. Bei den Wertepaaren, die die Parameter „Farbintensität“ und jeweiliger „Flächenanteil“ bzw. „Prozentsatz“ antigenexprimierender Zellen beschreiben, wurde ein Produkt aus dem mittleren Flächen- bzw. Zellanteil und dem Intensitätswert gebildet (Tabellen 7 und 8). Die erhaltenen Ergebnisse wurden für jedes Gesichtsfeld summiert, insofern mehrere Farbintensitäten beobachtet wurden. Ein Anwendungsbeispiel zeigt Abbildung 6.

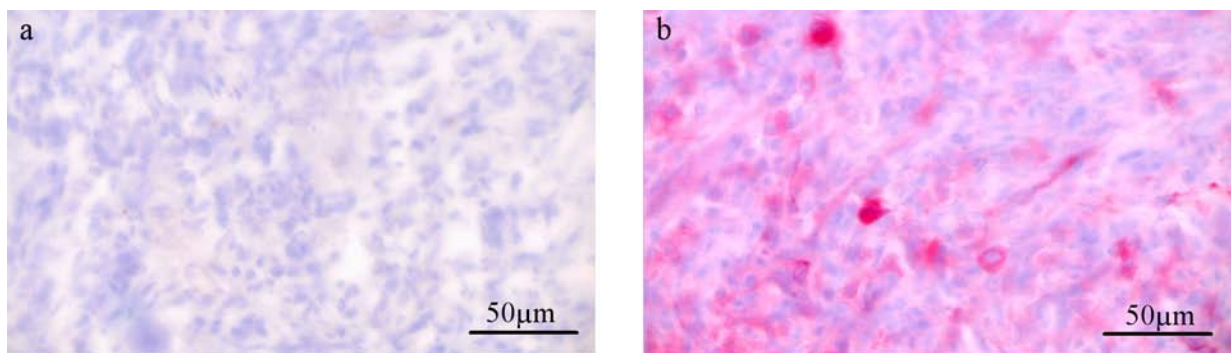


Abb.	Farbintensität	x	Mittlerer Anteil antigenexprimierender Zellen pro Gesichtsfeld in %	=	Produktsomme
<b>a</b>	3	x	0	=	+ 0
	2	x	0	=	+ 0
	1	x	0	=	+ 0
	0	x	100	=	+ 0
					<u>0</u>
<b>b</b>	3	x	13	=	+ 39
	2	x	38	=	+ 76
	1	x	38	=	+ 38
	0	x	0	=	+ 0
					<u>153</u>

#### Abbildung 6: Anwendungsbeispiel

Dargestellt sind exemplarische Gesichtsfelder gegen MMP-2 gefärbter Präparate und die zugehörige Bestimmung ihrer Expressionsdichte. Die bläulichen hämatoxylingefärbten Zellkerne liegen in unterschiedlich stark rötlichem Zytoplasma, dessen Färbung mit der MMP-2-Expression korreliert. Die Zellen in (a) sind zu 100% MMP-2-negativ. Der Wert der Expressionsdichte beträgt daher 0. Das Gewebe in (b) ist in unterschiedlichem Maße MMP-2-positiv. Eine starke Farbintensität, gekennzeichnet durch den Wert 3, ist beispielsweise in 1-25% der Zellen erkennbar. Der Mittelwert für diesen Zellanteil beträgt 13% und wird mit dem Wert für die Intensität multipliziert. Entsprechend werden auch für die anderen Farbintensitäten entsprechende Produkte gebildet und anschließend addiert. Es ergibt sich für die Probe somit ein Wert der Expressionsdichte von 153. Die Beschreibung von Zellanteilen pro Gesichtsfeld mit „0%“ erfolgt in diesem Beispiel aus anschaulichen Gründen.

Anschließend wurde für jede Referenz- bzw. Tumorprobe aus den Werten der meist 20 Gesichtsfelder der Mittelwert berechnet. Im folgenden wird dieser als Expressionsdichte bezeichnet. Er kann zwischen 0 (Antigennegativität) und 300 (maximale Antigenpositivität) liegen. In dieser Arbeit wurde der Wert 0 als negativ und Werte bis  $< 60$  als „niedrig“ eingestuft. (Der Wert 60 beschreibt zum Beispiel eine Probe, in der 60% der Gesichtsfelder zu 100% durch eine schwache Immunreaktivität gekennzeichnet sind.) Eine Expressionsdichte  $\geq 60$  und  $< 120$  galt als „mittel“, während Werte  $\geq 120$  mit „hoch“ und  $\geq 180$  als „sehr hoch“ beschrieben wurden.

Die Darstellung der Expressionsdichte erfolgte in dieser Arbeit zunächst in Form von Mittelwerten  $\pm$  einfacher Standardabweichung für jeden untersuchten Gewebeanteil. Die einzelnen Werte der Expressionsdichte zeigten jedoch keine Normalverteilung. In Diagrammen wurden sie daher als Boxplots dargestellt. Im Gegensatz zum Balkendiagramm wird hier nicht der Mittelwert, sondern der Median und die Verteilung der Werte abgebildet.

Zur statistischen Auswertung wurde zunächst eine deskriptive Analyse durchgeführt. Die Antigenexpression von Referenz- und Glioblastomproben wurde mit dem Mann-Whitney-Test auf signifikante Unterschiede überprüft. Bei diesem globalen Test werden die miteinander verglichenen Gruppen als voneinander unabhängig eingestuft. Ging es um Tumor- und Invasionszone oder um verschiedene Gewebeanteile der Glioblastomproben, so war auch ein direkter Vergleich auf Ebene der einzelnen Tumorproben möglich. Gleiches galt für die graue und weiße Substanz der Referenzproben. In diesen Fällen erfolgte eine Überprüfung auf signifikante Unterschiede mit dem Wilcoxon-Test. Zur grafischen Darstellung eines direkten Vergleichs wurden die Differenzen der verglichenen Werte jeder Probe in einem Boxplot abgebildet. Überwiegend positive Werte ( $>0$ ) zeigen an, dass der Minuend größer war als der Subtrahend. Umgekehrtes gilt für negative Werte ( $<0$ ). Der Wert Null markiert, dass Minuend und Subtrahend gleich groß waren.

Um die Häufigkeit verschiedener Ausprägungen einer Tumorgrenze in den NCAM-140-Präparaten auf signifikante Unterschiede zu überprüfen, wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet. Außerdem wurde untersucht, ob ein monotoner Zusammenhang zwischen den Ausprägungen der Tumorgrenze und der NCAM-140-Immunreaktivität besteht. Hierfür wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho genutzt. Mit ihm wurde auch die Expression verschiedener Antigene auf einen monotonen Zusammenhang untersucht. Bei einem Wert des Koeffizienten zwischen 0,3 und 0,7 wurde der Zusammenhang als mäßig, unterhalb dieses Bereiches als schwach bzw. darüber als stark eingestuft. In allen statistischen Untersuchungen galt ein Ergebnis dann als signifikant, wenn als Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  zutraf.



## 6 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression verschiedener Antigene in der Tumorzone und der Invasionszone humaner Glioblastome untersucht. Insbesondere bestand die Fragestellung, ob regionale Expressionsunterschiede zwischen den beiden Zonen auszumachen sind und es möglicherweise erlauben, eine Tumorgrenze zu definieren. Die Analyse erfolgte immunhistochemisch für NCAM-140, MMP-2 und den Gerinnungsfaktor X. Dabei wurde die jeweilige Expressionsdichte ermittelt, die die Intensität der Immunreaktivität und den exprimierenden Zellanteil beschreibt.

### 6.1 Expression von NCAM-140

#### 6.1.1 Makroskopische Bewertung der NCAM-140-Expression

##### 6.1.1.1 Makroskopische Bewertung von NCAM-140 in den Referenzproben

Die graue Substanz des tumorfreien Referenzgewebes zeigte bei makroskopischer Betrachtung in 65% der Fälle eine „hohe“ und in 20% eine „sehr hohe“ Expressionsdichte von NCAM-140. In drei der 20 Proben war eine lediglich „mittlere“ Expressionsdichte zu verzeichnen. Der Mittelwert und die einfache Standardabweichung der Expressionsdichte von NCAM-140 betrugen in der grauen Substanz  $163,06 \pm 47,59$ .

Die weiße Substanz der tumorfreien Referenzproben zeichnete sich zu 80% durch eine „niedrige“ NCAM-140-Expressionsdichte aus. In drei der insgesamt 20 Proben war die weiße Substanz NCAM-140-negativ, in einer lag die Expressionsdichte im „mittleren“ Bereich. Der Mittelwert und die Standardabweichung der NCAM-140-Expressionsdichte in der weißen Substanz der Referenzproben betrugen  $18,45 \pm 16,00$ . Tabelle 9 gibt eine Zusammenfassung der Mittelwerte sowie der einfachen Standardabweichung der jeweiligen Expressionsdichte.

**Tabelle 9: Makroskopisch ermittelte NCAM-140-Expressionsdichte der Referenz- und der Tumorproben**  
Angaben sind der Mittelwert und die einfache Standardabweichung.

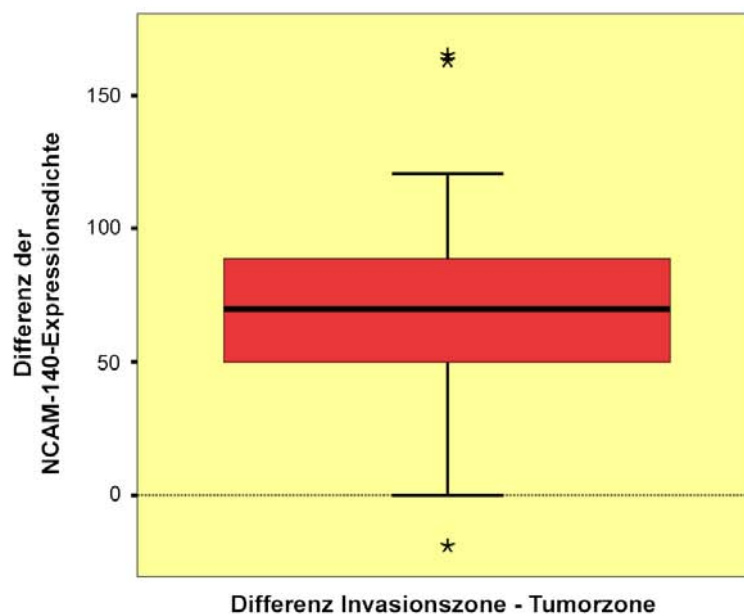
Gewebetyp	Mittelwert	±	Standardabweichung
Graue Substanz makroskopisch	163,06	±	47,59
Weißer Substanz makroskopisch	18,45	±	16,00
Tumorzone makroskopisch	37,11	±	24,11
Invasionszone makroskopisch	102,28	±	39,86

Der Wilcoxon-Test bestätigte eine signifikant höhere Expressionsdichte von NCAM-140 in der tumorfreien grauen Substanz als in der weißen Substanz der jeweils gleichen Probe. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  war kleiner als 0,001. Eine Übersicht über die Ergebnisse der statistischen Auswertung bietet Tabelle 10.

### 6.1.1.2 Makroskopische Bewertung von NCAM-140 in Glioblastomen

Die makroskopische Analyse der Glioblastome ergab in 71% der Fälle eine „niedrige“ Expressionsdichte von NCAM-140 in der Tumorzone. In diesen Präparaten waren durchschnittlich 87% der Tumorzonenfläche NCAM-140-negativ. 6% der Glioblastomproben besaßen eine durchgängig NCAM-140-negative Tumorzone. Bei den übrigen zwölf der untersuchten 52 Glioblastomproben lag die Expressionsdichte des Antigens im „mittleren“ Bereich. Der Mittelwert und die einfache Standardabweichung der NCAM-140-Expressionsdichte betrugen in der Tumorzone  $37,11 \pm 24,11$ .

In 43 Tumorproben war eine Invasionszone auszumachen. Sie wurde bei makroskopischer Betrachtung in 60% der Fälle durch eine „mittlere“ NCAM-140-Expressionsdichte gekennzeichnet. In 26% der Proben zeigte sich eine „hohe“ Expressionsdichte, in einem Fall sogar eine „sehr hohe“. In nur fünf Glioblastomproben war eine „niedrige“ oder „negative“ NCAM-140-Expression der Invasionszone festzustellen. Der Mittelwert und die einfache Standardabweichung der NCAM-140-Expressionsdichte betrugen in der Invasionszone  $102,28 \pm 39,86$ . Tabelle 9 gibt eine Übersicht über die Mittelwerte der NCAM-140-Expressionsdichte bei makroskopischer Betrachtung. Ein direkter Vergleich der Tumorzone und der Invasionszone in jeder Probe ergab, dass in der Invasionszone eine signifikant höhere Expressionsdichte von NCAM-140 besteht als in der Tumorzone. Der Unterschied zeigte sich im Wilcoxon-Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  von weniger als 0,001 als signifikant (Tabelle 10). Abbildung 7 veranschaulicht den Unterschied.



**Abbildung 7: Differenzen der makroskopisch ermittelten NCAM-140-Expressionsdichte von Invasionszone und Tumorzone der jeweils gleichen Tumorprobe.** Das Diagramm zeigt anhand des Medians und der Ausdehnung des Boxplots für die Mehrzahl der Proben eindeutig positive Differenzwerte ( $>0$ ), die verdeutlichen, dass die NCAM-140-Expression der Invasionszone stärker ist als die der Tumorzone. Der Unterschied erwies sich im Wilcoxon-Test als signifikant. Die Sterne markieren Ausreißer.

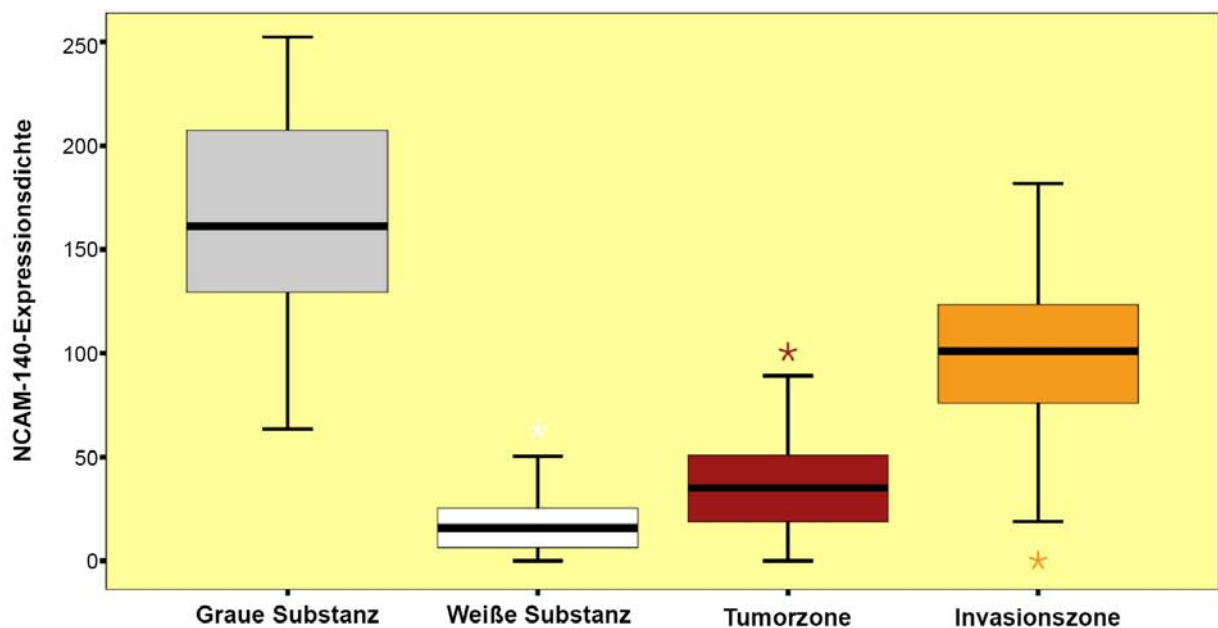
### 6.1.1.3 NCAM-140-Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Referenzproben

Die makroskopisch ermittelte NCAM-140-Expressionsdichte in Glioblastomen und dem tumorfreien Referenzgewebe wurde mit dem Mann-Whitney-Test auf signifikante Unterschiede überprüft (Tabelle 10). Es war festzustellen, dass sowohl die Tumorzone als auch die Invasionszone eine signifikant geringere Expressionsdichte von NCAM-140 aufwiesen als die graue Substanz der Referenzproben. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  war für beide Ergebnisse jeweils kleiner als 0,001.

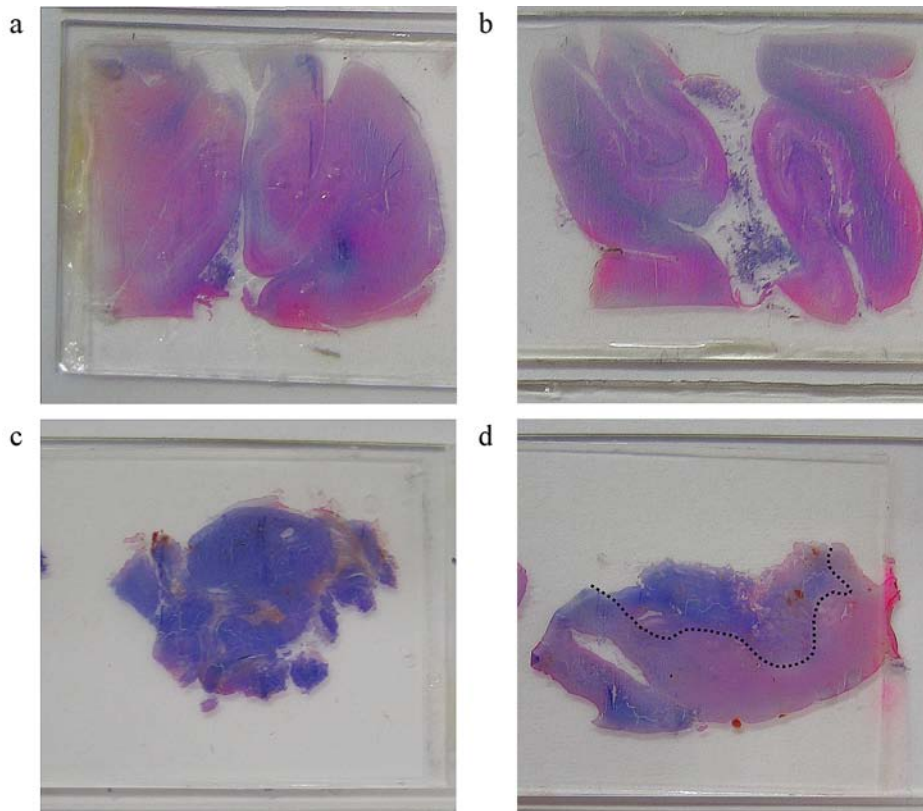
Die Expression des Antigens NCAM-140 lag jedoch in beiden Zonen der Tumorproben signifikant über der der weißen Substanz des Referenzgewebes. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  betrug 0,002 für den Vergleich zwischen Tumorzone und weißer Substanz. Bezüglich der Gegenüberstellung von Invasionszone und weißer Substanz war  $p$  kleiner als 0.001. Einen Eindruck von diesen Expressionsunterschieden vermitteln das Diagramm in Abbildung 8 sowie die Abbildung 9.

**Tabelle 10: Ergebnisse der statistischen Auswertung makroskopisch ermittelter NCAM-140-Expressionsdichte.** Signifikante Unterschiede sind in der Tabelle orange unterlegt. Der angegebene Wert ist die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorliegen eines signifikanten Unterschieds.

	Graue Substanz	Weißer Substanz	Tumorzone
Weißer Substanz	< 0,001		
Tumorzone	< 0,001	0,002	
Invasionszone	< 0,001	< 0,001	< 0,001



**Abbildung 8: Makroskopisch ermittelte NCAM-140-Expressionsdichte der tumorfreien Referenzproben und der Glioblastomproben.** Das Diagramm zeigt, dass die Expressionsdichte in der Tumorzone und der Invasionszone der Glioblastomproben niedriger ist als in der grauen Substanz, jedoch höher als in der weißen Substanz der Referenzproben. Der Mann-Whitney-Test wies nach, dass die Unterschiede signifikant sind. Die Sterne markieren Ausreißer.



**Abbildung 9: Makroskopisch sichtbare NCAM-140-Immunreaktivität**

**(a) und (b) Referenzproben:** Die intensiv rötliche Färbung der grauen Substanz spiegelt eine starke NCAM-140-Expression wider. Die weiße Substanz ist weitgehend NCAM-140-negativ. Sie imponiert durch eine bläuliche Färbung, die durch die Anfärbung der Zellkerne mit Hämatoxylin verursacht wird.

**(c) und (d) Glioblastomproben:** Die Tumorzone in (c) ist NCAM-140-negativ. In (d) zeigt die geringe rötliche Färbung der Tumorzone, welche sich im oberen Teil des Präparates befindet, eine schwache NCAM-140-Immunreaktivität an. Im unteren Bereich des Präparates (d) ist die moderat bis stark NCAM-140-positive Invasionszone abgebildet. Die eingefügte Hilfslinie markiert die relativ scharfe Tumorgrenze.

## 6.1.2 Lichtmikroskopische Bewertung der NCAM-140-Expression

### 6.1.2.1 Lichtmikroskopische Bewertung von NCAM-140 in den Referenzproben

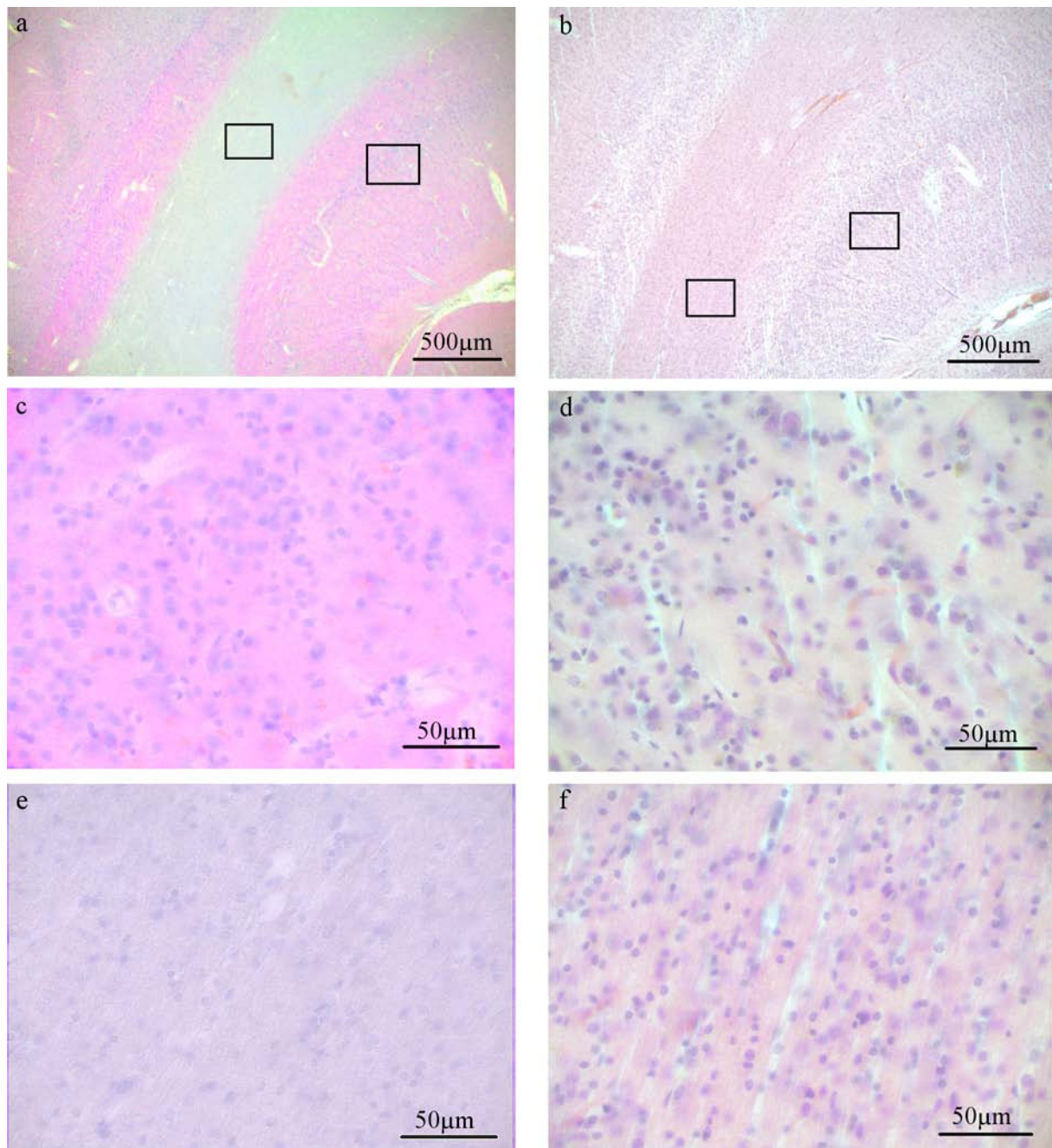
Die lichtmikroskopische Analyse der Referenzproben zeigte in 55% der Fälle eine „sehr hohe“ Expressionsdichte von NCAM-140 in der grauen Substanz. In weiteren 40% der Fälle lag sie auf „hohem“ Niveau. Lediglich eine der 20 Proben besaß nur eine „mittlere“ Expressionsdichte des Antigens in der grauen Substanz. Der Mittelwert mit der einfachen Standardabweichung der NCAM-140-Expressionsdichte betrug  $177,79 \pm 42,01$ .

Kennzeichnend für die lichtmikroskopische Untersuchung der weißen Substanz war eine „niedrige“ NCAM-140-Expressionsdichte in 100% der Referenzproben. Der Mittelwert und die Standardabweichung der NCAM-140-Expressionsdichte betrugen in der weißen Substanz  $9,79 \pm 11,16$ . Tabelle 11 zeigt die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen der lichtmikroskopisch ermittelten Expressionsdichte im Überblick. In Abbildung 10 wird die NCAM-140-Immunfärbung der H/E-Färbung der gleichen Referenzprobe gegenüber gestellt.



**Tabelle 11: Lichtmikroskopisch ermittelte NCAM-140-Expressionsdichte der Referenz- und der Tumorproben . Angegeben sind der Mittelwert und die einfache Standardabweichung.**

Gewebetyp	Mittelwert	±	Standardabweichung
Graue Substanz mikroskopisch	177,79	±	42,01
Weißer Substanz mikroskopisch	9,79	±	11,16
Tumorzone mikroskopisch	24,74	±	22,84
Invasionszone mikroskopisch	113,37	±	30,54



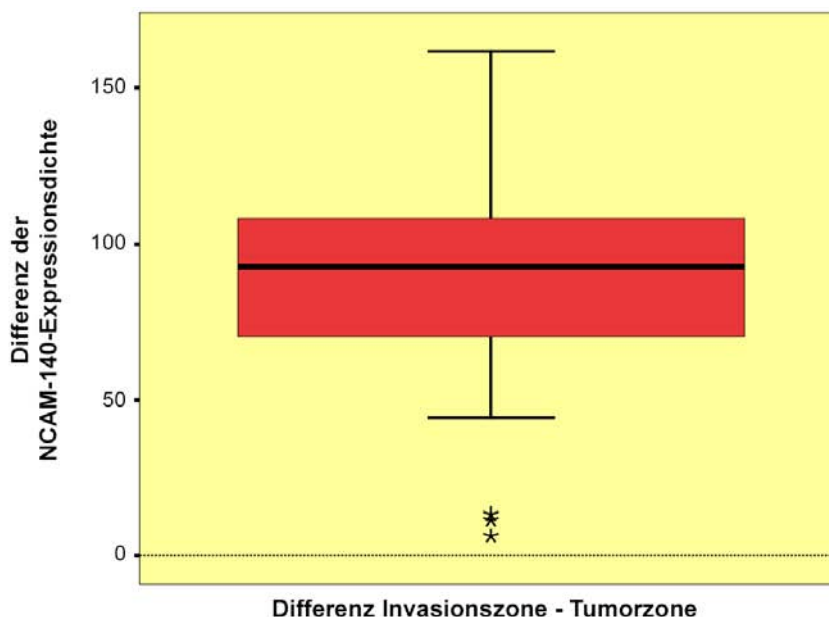
**Abbildung 10: Lichtmikroskopische Darstellung von grauer und weißer Substanz des Referenzgewebes**  
 In (a) ist eine Referenzprobe in NCAM-140-Immunfärbung abgebildet. (c) und (e) sind Vergrößerungen der in (a) markierten Ausschnitte. Die rötliche Färbung spiegelt die NCAM-140-Immunreaktivität wider und zeigt eine starke NCAM-140-Positivität der grauen Substanz in (c) neben der NCAM-140-negativen weißen Substanz in (e) an. Die Zellkerne sind durch Hämatoxylin bläulich gefärbt. Die Abbildung (b) stellte den entsprechenden Abschnitt der Referenzprobe in H/E-Färbung dar. Die graue Substanz in (d) und die weiße Substanz in (f) sind Vergrößerungen der in (b) markierten Ausschnitte.

Der Vergleich zwischen der NCAM-140-Expression der grauen und der weißen Substanz ergab eine höhere Expression des Antigens in der grauen Substanz. Der Unterschied zeigte sich im Wilcoxon-Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  von weniger als 0,001 als signifikant (Tabelle 12).

#### 6.1.2.2 Lichtmikroskopische Bewertung von NCAM-140 in Glioblastomen

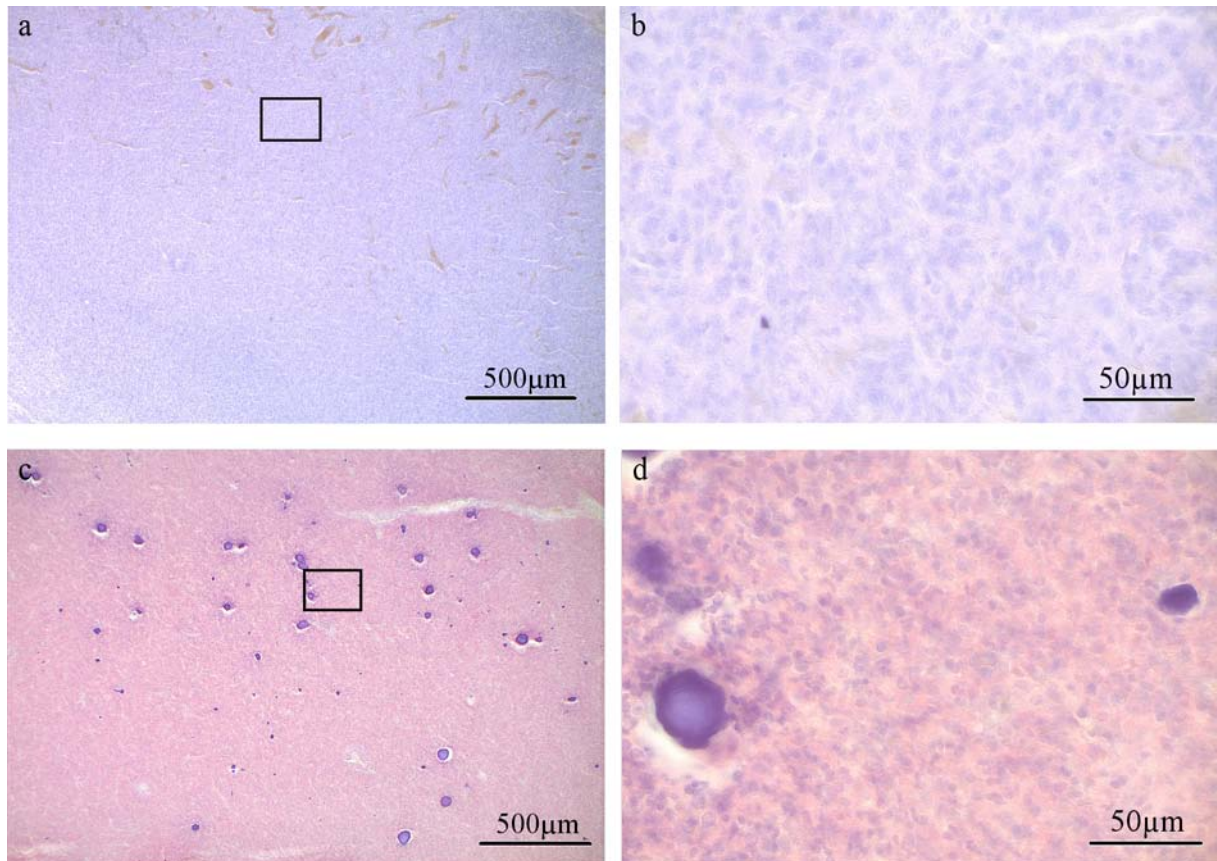
Bei der lichtmikroskopischen Analyse der Glioblastompräparate war die Tumorzone in 81% der Fälle durch eine „niedrige“ Expressionsdichte von NCAM-140 gekennzeichnet. In durchschnittlich 87% der Zellen dieser Proben waren die Zellen der Tumorzone NCAM-140-negativ. Weitere zwei der 52 Glioblastomproben besaßen eine durchgängig NCAM-140-negative Tumorzone. Die übrigen acht Tumorproben zeigten eine „mittlere“ Expressionsdichte in diesem Bereich. Der Mittelwert und die einfache Standardabweichung der NCAM-140-Expressionsdichte in der Tumorzone betrugen  $24,74 \pm 22,84$ .

43 der Glioblastomproben enthielten zudem eine Invasionszone. Sie war in 63% der Fälle durch eine „mittlere“ Expressionsdichte von NCAM-140 charakterisiert. In 32% der Glioblastome mit einer Invasionszone war eine „hohe“ NCAM-140-Expressionsdichte in dieser Zone zu beobachten. Eine der 43 identifizierbaren Invasionszonen besaß eine „sehr hohe“ Expressionsdichte des Antigens, eine weitere war negativ für NCAM-140. Der Mittelwert und die einfache Standardabweichung der NCAM-140-Expressionsdichte in diesem Bereich betrugen  $113,37 \pm 30,54$ . Tabelle 11 bietet eine Übersicht über die Mittelwerte der lichtmikroskopisch ermittelten Expressionsdichte.



**Abbildung 11:** Differenzen der lichtmikroskopisch ermittelten NCAM-140-Expressionsdichte von Invasionszone und Tumorzone der jeweils gleichen Tumorprobe. Das Diagramm zeigt für alle Proben eindeutig positive Differenzwerte ( $>0$ ), die verdeutlichen, dass die NCAM-140-Expression der Invasionszone stärker ist als die der Tumorzone. Der Unterschied war im Wilcoxon-Test signifikant. Die Sterne markieren Ausreißer.

In einem direkten Vergleich wurden die lichtmikroskopisch ermittelten NCAM-140-Expressionsdichtewerte der Tumorzone und der Invasionszone jeder Probe anschließend einander gegenüber gestellt. Bei Überprüfung mit dem Wilcoxon-Test war in der Invasionszone eine signifikant höhere Expressionsdichte von NCAM-140 als in der Tumorzone zu verzeichnen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  war hierfür kleiner als 0,001 (Tabelle 12). Einen Eindruck von diesem Ergebnis vermitteln das Diagramm in Abbildung 11 sowie das lichtmikroskopische Bild in Abbildung 12.



**Abbildung 12: Lichtmikroskopische NCAM-140-Immunreaktivität in Glioblastomproben**

Die in (a) dargestellte Tumorzone ist NCAM-140-negativ. Dies ist anhand der fehlenden rötlichen Zellfärbung erkennbar. Abbildung (b) ist die Vergrößerung des in (a) rechteckig markierten Ausschnitts. Die Invasionszone in (c) weist eine mäßige Immunreaktivität gegen NCAM-140 auf. Die Vergrößerung des in (c) markierten Ausschnitts befindet sich in Abbildung (d).

#### **6.1.2.3 NCAM-140-Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Referenzproben**

Für die mikroskopisch ermittelte NCAM-140-Expressionsdichte wurde ein Vergleich zwischen Glioblastomproben und dem tumorfreien Referenzgewebe durchgeführt. Ob signifikante Unterschiede vorlagen, wurde mit dem Mann-Whitney-Test überprüft (Tabelle 12).

Sowohl die Tumorzone als auch die Invasionszone wiesen eine signifikant geringere Expressionsdichte von NCAM-140 auf als die graue Substanz der Referenzproben. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  war für diese beiden Ergebnisse jeweils kleiner als 0,001.

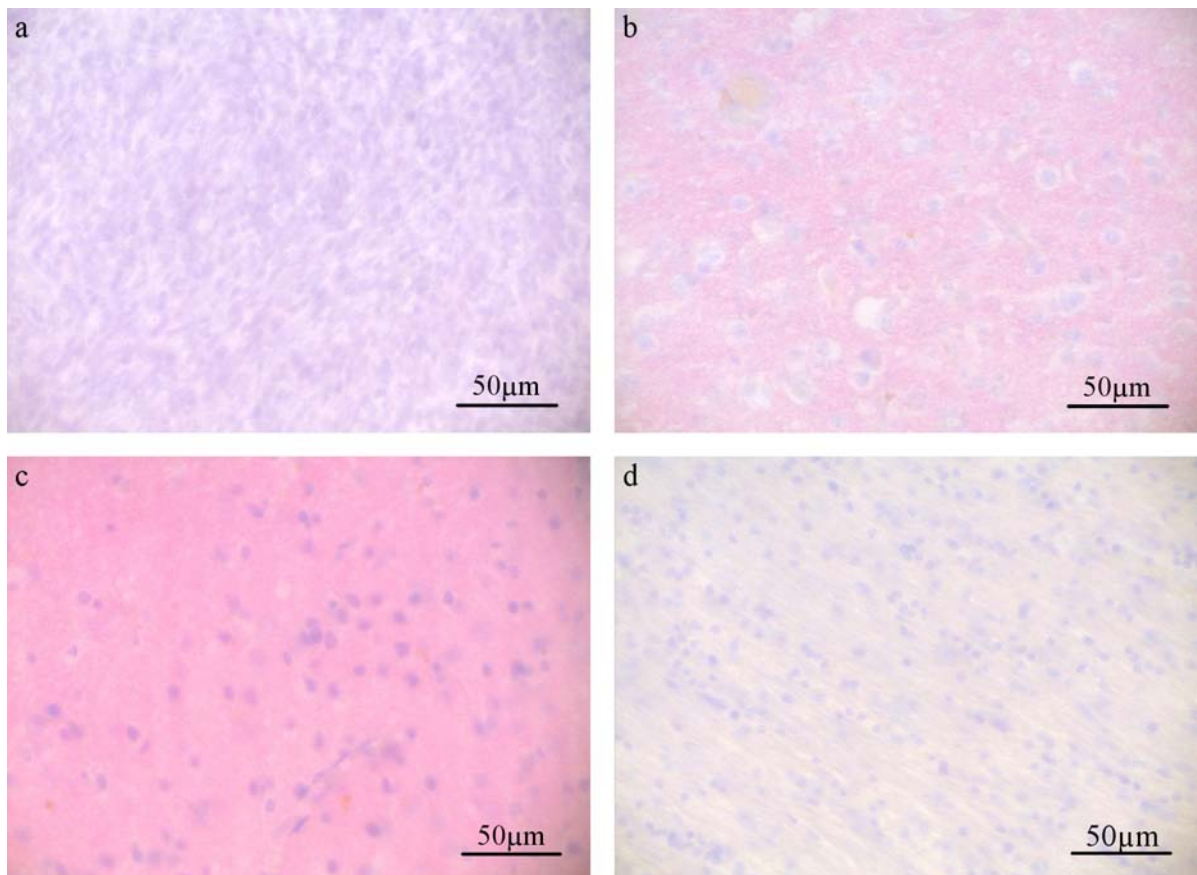


**Tabelle 12: Ergebnisse der statistischen Auswertung lichtmikroskopisch ermittelter NCAM-140-Expressionsdichte.** Signifikante Unterschiede sind in der Tabelle orange unterlegt. Der angegebene Wert ist die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorliegen eines signifikanten Unterschieds.

	Graue Substanz	Weißer Substanz	Tumorzone
Weißer Substanz	< 0,001		
Tumorzone	< 0,001	< 0,001	
Invasionszone	< 0,001	< 0,001	< 0,001

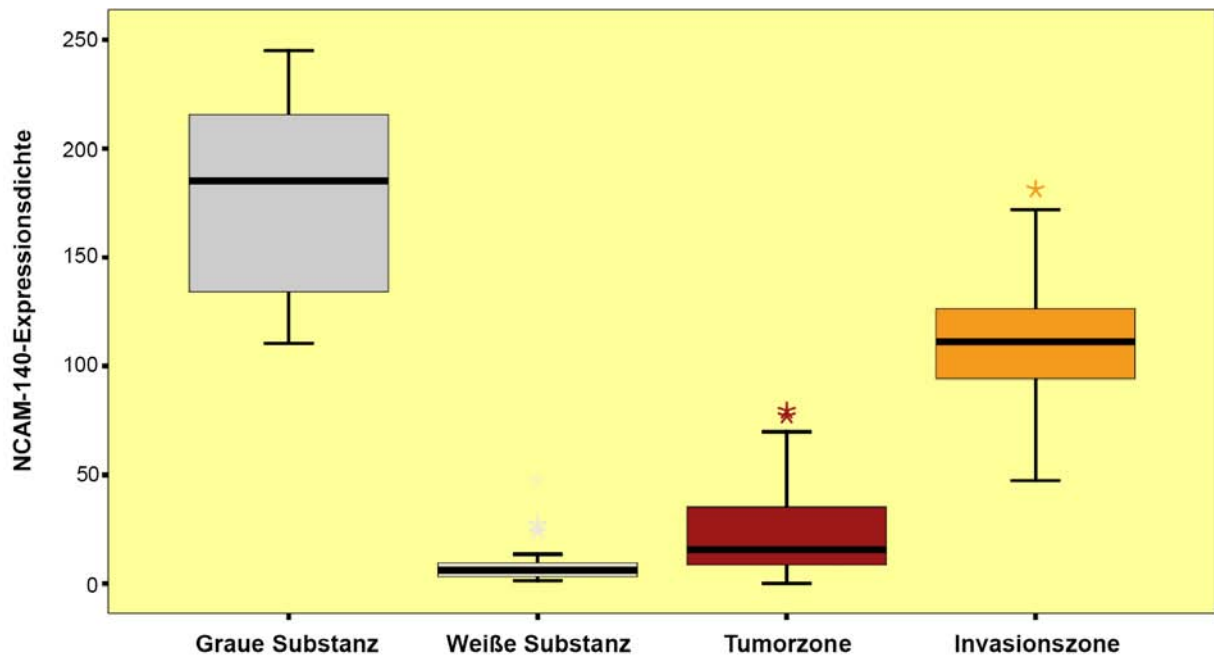
Die weiße Substanz zeigte durchgängig „niedrige Werte“ der NCAM-140-Expressionsdichte, während die Tumorzone der Glioblastomproben in zwei Fällen auch eine vollständige NCAM-140-Negativität aufwies. Dennoch lag die NCAM-140-Expressionsdichte der Tumorzone und der Invasionszone jeweils signifikant über der der weißen Substanz des Referenzgewebes. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  war für beide Gegenüberstellungen jeweils kleiner als 0,001.

Die lichtmikroskopische Darstellung in Abbildung 13 veranschaulicht dieses Ergebnis. Einen Eindruck von den beobachteten Unterschieden vermittelt zudem das Diagramm in Abbildung 14.



**Abbildung 13: Lichtmikroskopische NCAM-140-Immunreaktivität in den Tumor- und den Referenzproben** Dargestellt sind die Tumorzone (a), die Invasionszone (b), die graue Substanz der Referenzproben (c) und die weiße Substanz der Referenzproben (d). Die Intensität der Rotfärbung spiegelt die NCAM-140-Expression wider. Die NCAM-140-Expression nimmt von der grauen Substanz über die Invasionszone bis hin zur Tumorzone der Glioblastomproben stufenweise ab. Die Zellkerne sind durch Hämatoxylinfärbung bläulich dargestellt.





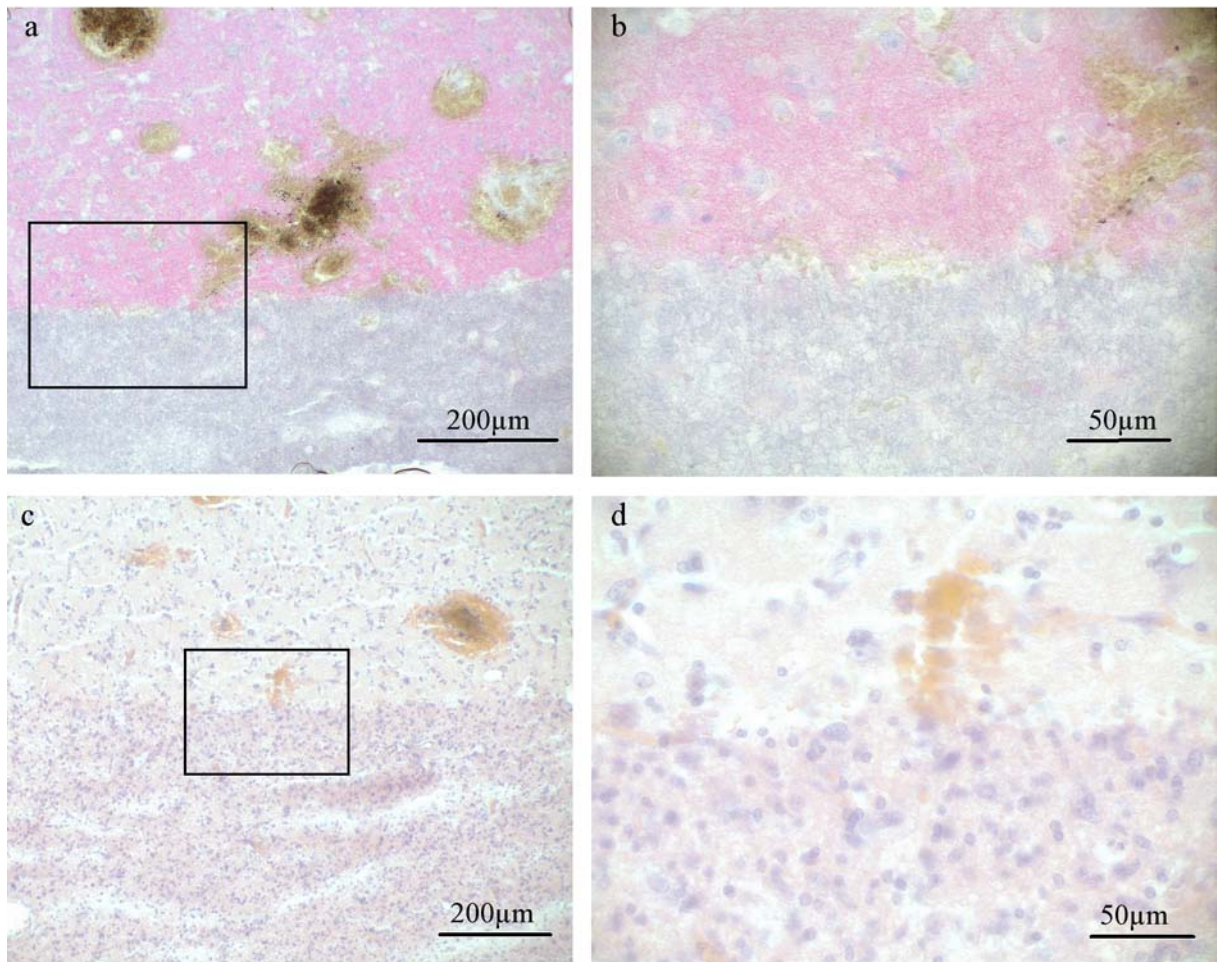
**Abbildung 14:** Lichtmikroskopisch ermittelte NCAM-140-Expressionsdichte des tumorfreien Referenzgewebes und der Glioblastomproben. Das Diagramm zeigt, dass die Expressionsdichte in der Tumorzone und der Invasionszone der Glioblastomproben niedriger ist als in der grauen Substanz, jedoch höher als in der weißen Substanz der Referenzproben. Der Mann-Whitney-Test wies nach, dass die Unterschiede signifikant sind. Die Sterne markieren Ausreißer.

### 6.1.3 Abgrenzbarkeit von Tumorzone und Invasionszone

#### 6.1.3.1 Ausprägung der Tumorgrenze

In den Abschnitten 6.1.1.2 und 6.1.2.2 konnte gezeigt werden, dass die Invasionszone eine signifikant höhere Expressionsdichte von NCAM-140 aufwies als die Tumorzone. Daher wurde im folgenden untersucht, ob anhand der NCAM-140-Expression eine Tumorgrenze im Übergangsbereich von der Tumorzone zur Invasionszone zu identifizieren ist. Die Glioblastompräparate wurden hierzu auf einen Umschlag von NCAM-Negativität zu NCAM-Positivität hin überprüft. Das Kriterium vollständiger NCAM-Negativität erfüllten 4% der Glioblastomproben. Allerdings waren auch die Präparate mit einer „niedrigen“ NCAM-140-Expressionsdichte der Tumorzone in durchschnittlich 87% der Zellen NCAM-140-negativ. Eine überwiegende NCAM-140-Negativität der Tumorzone war daher für insgesamt 85% der Glioblastome kennzeichnend.

Bei der Charakterisierung der vermeintlichen Tumorgrenze wurde eine diffuse Einzelzellinvasion von einer diffusen Invasion von Zellnestern sowie von einer scharfen Tumorgrenze unterschieden. Zudem gab es Übergangsformen zwischen diesen drei Varianten. Die Abbildung 15 zeigt eine relativ scharfe Tumorgrenze in NCAM-140-Immundetektion sowie in H/E-Färbung zum morphologischen Vergleich. Ein weiteres Beispiel einer scharfen Tumorgrenze ist in Abbildung 16 dargestellt.

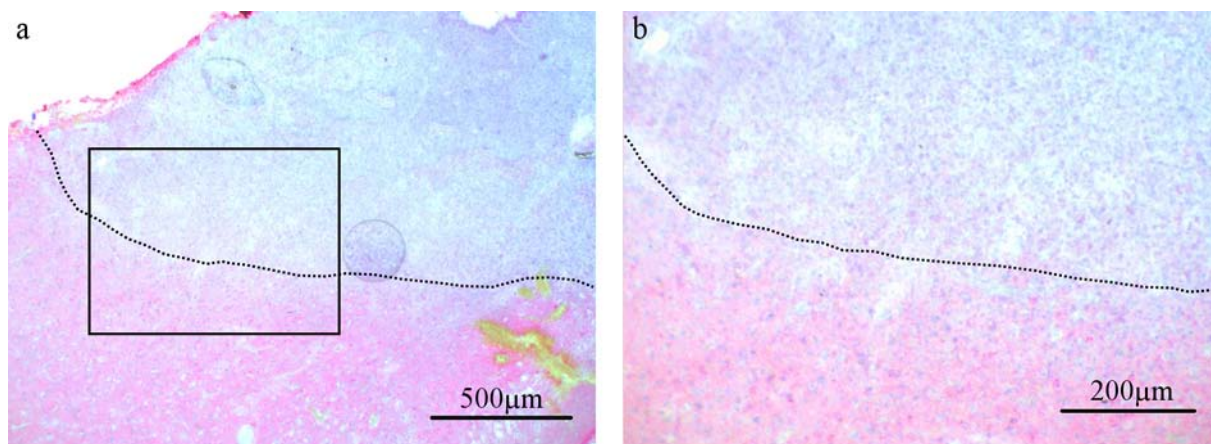


**Abbildung 15: Lichtmikroskopische Darstellung einer relativ scharfen Tumorgrenze**

Die NCAM-140-Immunfärbung in (a) zeigt anhand der rötlichen Färbung, dass die Invasionszone (oben) stark NCAM-140-positiv ist, während sich die Tumorzona (unten) als NCAM-140-negativ erweist. Die Grenze zwischen beiden Tumorbereichen ist scharf. Dies zeigt sich auch in der Vergrößerung (b) des in (a) markierten Ausschnitts. Zum Vergleich ist die H/E-Färbung des entsprechenden Tumorbereiches in Abbildung (c) dargestellt. In der Tumorzona (unten) zeigt sich insbesondere eine wesentlich höhere Zelldichte als in der Invasionszone (oben). Der markierte Ausschnitt aus Abbildung (c) ist in (d) vergrößert dargestellt.

Zur Bewertung der Tumorgrenze standen 43 Proben zur Verfügung, die neben einer Tumorzona auch eine Invasionszone aufwiesen. Berücksichtigung bei der Bewertung konnten 41 Tumورproben finden, bei denen beide Regionen auch offensichtlich gewebemorphologisch benachbart waren. Daneben existierten zwei Präparate, die aus mehreren Gewebestücken bestanden, ohne dass deren ursprüngliche Position zueinander noch genau nachvollziehbar war.

Eine diffuse Einzelzellinvasion war in 24,4% der Glioblastome zu beobachten. Keine der untersuchten Proben wies eine diffuse Invasion von Tumorzellnestern auf. Übergangsformen zwischen einer diffusen Einzelzellinvasion und einer scharfen Tumorgrenze traten in 53,7% der Tumore auf. Eine scharfe Tumorgrenze war in 21,9% der Tumورproben erkennbar (Tabelle 13).



**Abbildung 16: Lichtmikroskopische Darstellung einer relativ scharfen Tumorgrenze in NCAM-140-Immunfärbung.** Abbildung (a) zeigt, dass sich die intensiv rötlich gefärbte Invasionszone (unten) relativ scharf von der Tumorzone (oben) abgrenzt, die nahezu keine rötliche Färbung aufweist. Die rötliche Färbung spiegelt die NCAM-140-Immunreaktivität wider. Der in (a) markierte Ausschnitt ist in Abbildung (b) vergrößert dargestellt. Die gestrichelte Hilfslinie markiert jeweils die vermeintliche Tumorgrenze.

**Tabelle 13: Charakterisierung der Tumorgrenze anhand der NCAM-140-Immunreaktivität**

Qualität der Grenze	Anteil von Tumorproben in %
Diffuse Invasion von Einzelzellen	24,4
Diffuse Invasion von Zellnestern	0,0
Übergangsformen	53,7
Scharfe Tumorgrenze	21,9

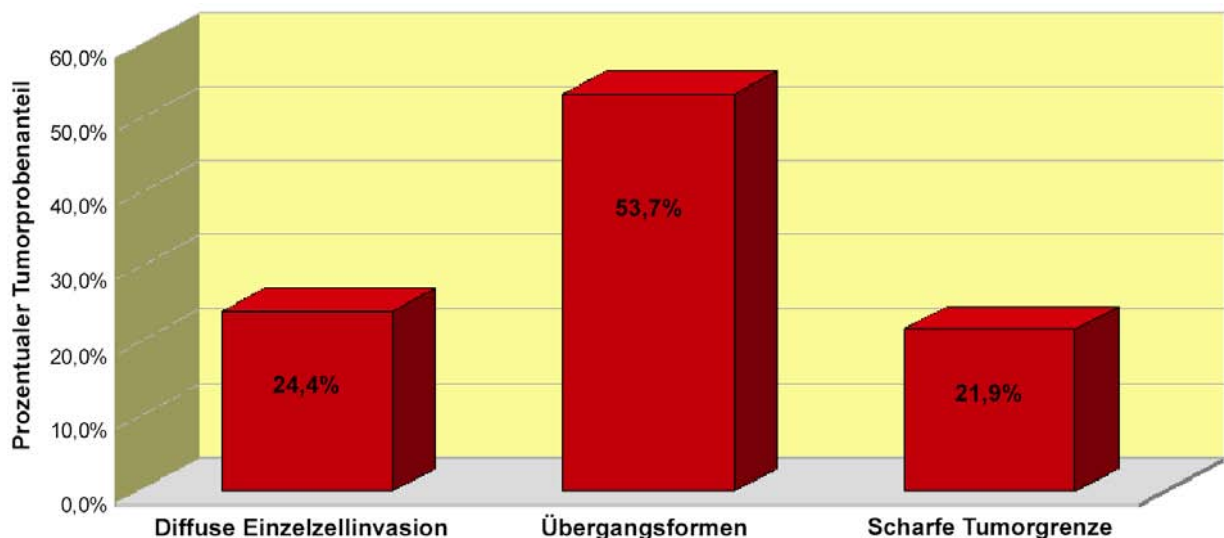
Mit dem Chi-Quadrat-Test wurde überprüft, ob signifikante Unterschiede zwischen der Häufigkeit der jeweiligen Typen der Tumorgrenze bestanden. Es zeigte sich, dass Übergangsformen zwischen einer diffusen Einzelzellinvasion und einer scharfen Tumorgrenze nahezu gleich häufig auftraten wie die übrigen Varianten einer Tumorgrenze zusammen. Signifikante Unterschiede bestanden zwischen den beiden Gruppen nicht. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorliegen eines signifikanten Unterschieds betrug 0,755. Gegenüber einer scharfen Tumorgrenze waren Übergangsformen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  von 0,029 signifikant häufiger zu beobachten. Ebenso waren sie tendenziell häufiger als eine diffuse Einzelzellinvasion. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorliegen eines signifikanten Unterschieds betrug hierfür 0,050. Der Anteil von Proben mit einer diffusen Einzelzellinvasion unterschied sich nicht signifikant von dem mit einer scharfen Tumorgrenze. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorliegen eines signifikanten Unterschieds betrug 1,000.

Eine scharfe Tumorgrenze oder eine Übergangsform zwischen einer diffusen Einzelzellinvasion und einer scharfen Tumorgrenze sind die Varianten eines Übergangs von der Tumorzone zur Invasionszone, die die Darstellung einer Tumorgrenze erlauben. Zusammen waren die Proben mit diesen Merkmalen signifikant häufiger als die Glioblastomproben mit

einer diffusen Einzelzellinvasion. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  betrug für dieses Ergebnis 0,001 (Tabelle 14). In dem überwiegenden Anteil der Tumore war somit eine vermeintliche Tumorgrenze definierbar. Das Diagramm in Abbildung 17 veranschaulicht das beschriebene Ergebnis.

**Tabelle 14: Ergebnisse des statistischen Vergleichs zwischen der Häufigkeit der beobachteten Varianten einer Tumorgrenze.** Signifikante Unterschiede sind in der Tabelle orange unterlegt. Der angegebene Wert ist die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorliegen eines signifikanten Unterschieds.

	Diffuse Einzelzellinvasion	Scharfe Tumorgrenze	Diffuse Einzelzellinvasion + scharfe Tumorgrenze
Übergangsformen	0,050	0,029	0,755
Scharfe Tumorgrenze	1,000		
Übergangsformen + scharfe Tumorgrenze	0,001		



**Abbildung 17: Varianten der durch NCAM-140-Immunreaktivität angezeigten Tumorgrenze**

Übergangsformen zwischen einer diffusen Einzelzellinvasion und einer scharfen Tumorgrenze waren in den untersuchten Glioblastomen am häufigsten zu beobachten. Eine diffuse Einzelzellinvasion trat in einer ähnlichen Anzahl von Proben auf wie eine scharfe Tumorgrenze. Die Varianten eines Übergangs von Tumor- und Invasionszone, die die Darstellbarkeit einer Tumorgrenze erlauben (Übergangsformen bzw. eine scharfe Tumorgrenze), waren zusammen entsprechend des Chi-Quadrat-Tests signifikant häufiger als eine diffuse Einzelzellinvasion. Keine der untersuchten Proben war durch eine diffuse Invasion von Zellnestern gekennzeichnet.

Die Darstellbarkeit einer vermeintlichen Tumorgrenze war nicht nur auf die lichtmikroskopische Betrachtung beschränkt. Auch bei der makroskopischen Betrachtung mit dem bloßen Auge konnte teilweise ein scharfer Umschlag von überwiegender NCAM-140-Negativität zu NCAM-140-Positivität verzeichnet werden. Beispiele hierfür zeigt die Abbildung 18.





**Abbildung 18: NCAM-140-detektierte Glioblastompräparate in makroskopischer Ansicht**

Die Tumorzone ist in den Abbildungen anhand einer fehlenden oder geringen Rottfärbung durch eine negative oder schwach positive NCAM-140-Immunreaktivität gekennzeichnet. Sie erscheint durch Anfärbung der Zellkerne mit Hämatoxylin bläulich. Die NCAM-140-positive Invasionszone zeigt eine deutlich rötliche Färbung. Der Umschlag von NCAM-Negativität zu NCAM-Positivität bildet eine relativ scharfe Grenze, die jeweils durch eine schwarze Hilfslinie markiert ist.

#### **6.1.3.2 Verhältnis zwischen NCAM-140-Expressionsdichte und Darstellbarkeit einer Tumorgrenze**

Im Anschluss an die Charakterisierung der vermeintlichen Tumorgrenze wurde untersucht, ob deren Darstellbarkeit abhängig von der NCAM-140-Expressionsdichte der Tumorzone ist. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho zeigte keinen signifikant monotonen Zusammenhang zwischen der NCAM-140-Expressionsdichte der Tumorzone und der Abgrenzbarkeit von Tumorzone und Invasionszone. Hingegen konnte auf signifikantem Niveau ein mäßig positiver monotoner Zusammenhang zwischen der NCAM-140-Expressionsdichte der Invasionszone und der Abgrenzbarkeit beider Zonen verzeichnet werden.

Eine steigende NCAM-140-Expressionsdichte der Invasionszone war also verknüpft mit einer besseren Darstellbarkeit der Tumorgrenze. Die NCAM-140-Expressionsdichte der Tumorzone war in den untersuchten Proben hingegen nicht signifikant mit der Abgrenzbarkeit von Tumor- und Invasionszone assoziiert.

#### **6.1.4 Vergleich zwischen makroskopischer und lichtmikroskopischer Bewertung**

Die makroskopische und die lichtmikroskopische Bestimmung der NCAM-140-Expressionsdichte der grauen Substanz des Referenzgewebes zeigten in beiden Fällen überwiegend „hohe“ bis „sehr hohe“ Werte. Der weißen Substanz wurde durch beide Beurteilungsmethoden hauptsächlich eine „niedrige“ NCAM-140-Expressionsdichte zugeordnet. Ein direkter Vergleich zwischen makroskopisch und mikroskopisch ermittelten Werten mit dem Wilcoxon-Test ergab keine signifikanten Unterschiede.

Bei der Bestimmung der NCAM-140-Expressionsdichte der Tumorzone waren sowohl in der makroskopischen als auch der lichtmikroskopischen Beurteilung in der Mehrzahl der Fälle

„niedrige“ Werte zu verzeichnen. Mit dem Wilcoxon-Test waren signifikant niedrigere Werte bei der mikroskopischen Beurteilung im direkten Vergleich zu den makroskopischen Werten festzustellen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für dieses Ergebnis war kleiner als 0,001. Die Invasionszone wurde durch beide Beurteilungsmethoden in der Mehrzahl der Fälle durch „mittlere“ bis „hohe“ Werte der NCAM-140-Expressionsdichte charakterisiert. Ein direkter Vergleich mit dem Wilcoxon-Test zeigte signifikant höhere Werte bei lichtmikroskopischer als bei makroskopischer Bewertung mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  von 0,009.

Aufgrund dieser signifikanten Unterschiede zwischen makroskopischer und lichtmikroskopischer Beurteilung der Glioblastomproben ergaben sich auch unterschiedliche Differenzwerte zwischen der NCAM-140-Expressionsdichte der Invasionszone und der Tumorzone. Die Differenzen der lichtmikroskopisch gewonnenen Werte lagen signifikant über denen der makroskopisch gewonnenen. Die Unterschiede waren im Wilcoxon-Test signifikant. Eine Unterscheidung zwischen Tumor- und Invasionszone anhand der NCAM-140-Expression war also bei lichtmikroskopischer Betrachtung besser möglich als bei makroskopischer Untersuchung. Dennoch konnte auch bei makroskopischer Betrachtung gezeigt werden, dass die Invasionszone eine signifikant höhere NCAM-140-Expression aufweist als die Tumorzone. Eine Tumorgrenze war sowohl bei lichtmikroskopischer als auch bei makroskopischer Analyse vielfach darstellbar. Eine genaue Charakterisierung der Abgrenzbarkeit erfolgte jedoch nur durch die lichtmikroskopische Untersuchung. Die makroskopische Untersuchung wäre für diese Beurteilung unzureichend.

#### **6.1.5 Darstellung der wichtigsten Ergebnisse der NCAM-140-Expressionsanalyse**

Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse der Kapitel 6.1.1 bis 6.1.4 zusammengefasst. Bei makroskopischer Betrachtung zeigte die graue Substanz der Referenzproben die höchste NCAM-140-Expression von allen untersuchten Geweben, die weiße Substanz der Referenzproben die niedrigste. Eine negative oder sehr geringe NCAM-140-Expression war in 77% der Glioblastomproben für die Tumorzone kennzeichnend. Die Invasionszone war überwiegend durch eine mittlere Antigenexpressionsdichte charakterisiert. Sowohl in der grauen Substanz der Referenzproben als auch in der Invasionszone der Glioblastomproben war die NCAM-140-Expression signifikant höher als in der Tumorzone.

Die lichtmikroskopische Untersuchung zeigte ebenfalls die höchste NCAM-140-Expression in der grauen Substanz der Referenzproben. Die weiße Substanz der Referenzproben war durch die niedrigste Antigenexpression unter allen beurteilten Geweben gekennzeichnet. In 85% der Glioblastomproben war die Tumorzone durch eine negative oder sehr geringe NCAM-140-

Expression charakterisiert. Eine überwiegend mittlere Expressionsdichte des Antigens war für die Invasionszone kennzeichnend. Die NCAM-140-Expression der grauen Substanz der Referenzproben bzw. der Invasionszone der Glioblastomproben war signifikant höher als die der Tumorzone.

Anhand der NCAM-140-Immunreaktivität wurde die Darstellbarkeit der vermeintlichen Tumorgrenze in den Glioblastomproben lichtmikroskopisch charakterisiert. Der überwiegende Anteil der Proben wies eine scharfe Tumorgrenze oder eine Übergangsform zwischen einer diffusen Einzelzellinvasion und einer scharfen Tumorgrenze auf. Eine ausschließlich diffuse Einzelzellinvasion wurde in weniger als einem Viertel der Proben beobachtet. Keine der Proben zeigte eine diffuse Invasion von Tumorzellnestern. Auch makroskopisch war eine Tumorgrenze teilweise darstellbar.

## **6.2 Expression von MMP-2**

Für MMP-2 erfolgte keine makroskopische Auswertung, da dieses Antigen eher lokal gehäuft als weiträumig verteilt auftrat.

Die lichtmikroskopische Analyse unterschied bei den Referenzproben zwischen grauer Substanz und weißer Substanz. Neben dem eigentlichen Gewebe wurden einschichtige und mehrschichtige Gefäße differenziert betrachtet.

Bei den Glioblastomproben wurden Tumorzone und Invasionszone getrennt untersucht. In der Tumorzone wurde einerseits das Tumorgewebe exklusive Zellen der Pseudopalisaden und der Blutgefäße analysiert. Im folgenden wird dieser Gewebeanteil als „Tumorzone“ bezeichnet. Als weitere Gewebeanteile wurden Zellen der Pseudopalisaden am Rand von Nekrosezonen sowie einschichtige und mehrschichtige Blutgefäße der Tumorzone separat bewertet. Bei der Invasionszone wurde zunächst das Gewebe exklusive Gefäße analysiert. Daneben wurden einschichtige und mehrschichtige Blutgefäße der Invasionszone differenziert bewertet.

Da die Blutgefäße der untersuchten Gewebeproben meist nur in den Endothelzellen eine positive Immunreaktivität aufwiesen, wurden nur diese analysiert.

### **6.2.1 MMP-2 in den Referenzproben**

#### ***6.2.1.1 MMP-2-Expression der grauen Substanz***

Die graue Substanz des tumorfreien Referenzgewebes erwies sich in allen Fällen als negativ für MMP-2. Der Mittelwert der Expressionsdichte und die Standardabweichung betrugen  $0,00 \pm 0,00$ .

Eine Ausnahme von diesem Ergebnis stellten die Blutgefäße dar. 45% der Proben zeigten eine MMP-2-Positivität der mehrschichtigen Gefäße. Die Expressionsdichte war in zwei Drittel dieser Fälle „niedrig“. Jeweils einer der 20 untersuchten Referenzproben besaß eine „mittlere“, eine „hohe“ bzw. eine „sehr hohe“ Expressionsdichte des Antigens in den mehrschichtigen Gefäßen der grauen Substanz. In den übrigen 55% der Referenzproben war eine MMP-2-Negativität dieses Gewebeanteils zu beobachten. Der Mittelwert und die einfache Standardabweichung der Expressionsdichte betrugen  $27,02 \pm 54,39$ .

Die MMP-2-Expression der einschichtigen Blutgefäße der grauen Substanz verhielt sich ähnlich wie die der mehrschichtigen Gefäße. 65% der Referenzproben waren in diesem Gewebeanteil MMP-2-negativ. Drei der 20 Proben hatten eine „niedrige“ MMP-2-Expressionsdichte der einschichtigen Gefäße. Eine „mittlere“ bzw. eine „hohe“ Expressionsdichte von MMP-2 in den einschichtigen Blutgefäßen der grauen Substanz war in



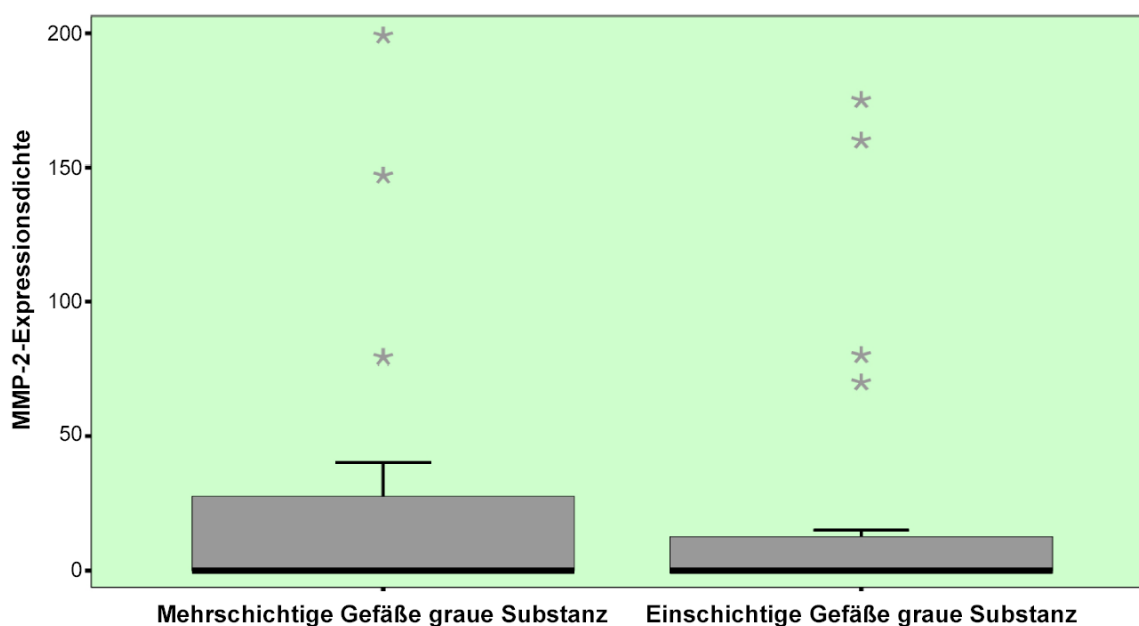
jeweils zwei Proben zu beobachten. Der Mittelwert der MMP-2-Expressionsdichte und die Standardabweichung betrugen  $25,60 \pm 53,68$  (Tabelle 15).

**Tabelle 15: MMP-2-Expressionsdichte der Referenzproben**

Angegeben sind der Mittelwert, die einfache Standardabweichung sowie der jeweils MMP-2-positive Probenanteil.

Gewebetyp	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	MMP-2-positiver Probenanteil
Graue Substanz	0,00 $\pm$ 0,00	0%
Mehrschichtige Gefäße grauer Substanz	27,02 $\pm$ 54,39	45%
Einschichtige Gefäße grauer Substanz	25,60 $\pm$ 53,68	35%
Weißer Substanz	0,00 $\pm$ 0,00	0%
Mehrschichtige Gefäße weißer Substanz	13,16 $\pm$ 39,52	20%
Einschichtige Gefäße weißer Substanz	7,75 $\pm$ 18,88	20%

An diese Analyse schloss sich ein Vergleich der MMP-2-Expression in den mehrschichtigen und einschichtigen Blutgefäßen der grauen Substanz an. Die Referenzproben mit MMP-2-positiven mehrschichtigen Gefäßen der grauen Substanz waren überwiegend mit denen identisch, deren einschichtige Gefäße in diesem Gewebebereich MMP-2-positiv waren. In einem direkten Vergleich der MMP-2-Expression einschichtiger und mehrschichtiger Blutgefäße der grauen Substanz mit Überprüfung durch den Wilcoxon-Test zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorliegen eines signifikanten Unterschieds betrug 0,646 (Tabelle 16). Abbildung 19 veranschaulicht die Expressionsdichte von MMP-2 in den Gefäßen der grauen Substanz.



**Abbildung 19: MMP-2-Expressionsdichte der Blutgefäße tumorfreier grauer Substanz**

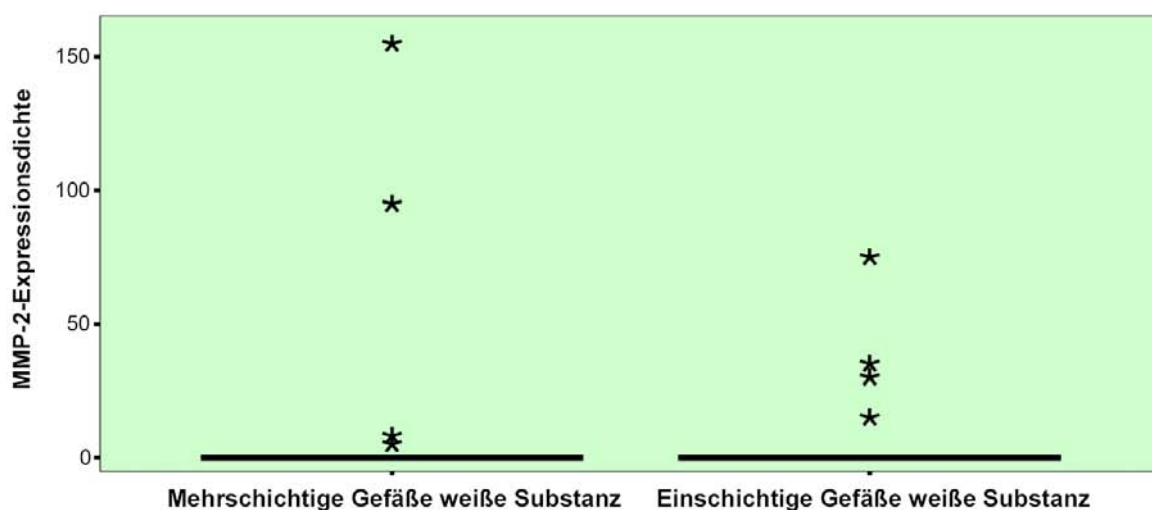
Der Median zeigt an, dass die mehrschichtigen und die einschichtigen Blutgefäße in der Mehrzahl der Fälle MMP-2-negativ waren. Einzelne Proben wiesen eine deutliche MMP-2-Positivität der mehrschichtigen bzw. der einschichtigen Gefäße auf. Die Sterne markieren Ausreißer. Signifikante Unterschiede zwischen den mehrschichtigen und den einschichtigen Gefäßen ergaben sich im Wilcoxon-Test nicht.

### 6.2.1.2 MMP-2-Expression der weißen Substanz

Die weiße Substanz wurde in allen tumorfreien Referenzproben durch eine MMP-2-Negativität charakterisiert. Der Mittelwert und die Standardabweichung der MMP-2-Expressionsdichte betrugen dementsprechend  $0,00 \pm 0,00$ .

Einzelne Ausnahmen von diesem Ergebnis stellten Blutgefäße dar. Mehrschichtige Gefäße besaßen in 80% der Proben ein MMP-2-negatives Endothel. Bei zwei der 20 Proben war die Antigenexpressionsdichte in diesem Gewebeanteil „niedrig“. Eine „mittlere“ bzw. „sehr hohe“ Expressionsdichte von MMP-2 in den mehrschichtigen Blutgefäßen der weißen Substanz war in jeweils einem Fall zu beobachten. Der Mittelwert und die einfache Standardabweichung der MMP-2-Expressionsdichte in den mehrschichtigen Gefäßen betrugen  $13,16 \pm 39,52$ .

Analog waren die einschichtigen Gefäße der weißen Substanz in 80% der Referenzproben MMP-2-negativ. Drei der 20 Proben wiesen eine „niedrige“ MMP-2-Expressionsdichte dieses Gewebeanteils auf. Eine „mittlere“ Expressionsdichte von MMP-2 in einschichtigen Blutgefäßen wurde in einer Probe festgestellt. Der Mittelwert und die einfache Standardabweichung der MMP-2-Expressionsdichte in den einschichtigen Blutgefäßen betrugen  $7,75 \pm 18,88$  (Tabelle 15).



**Abbildung 20: MMP-2-Expressionsdichte der Blutgefäße tumorfreier weißer Substanz**

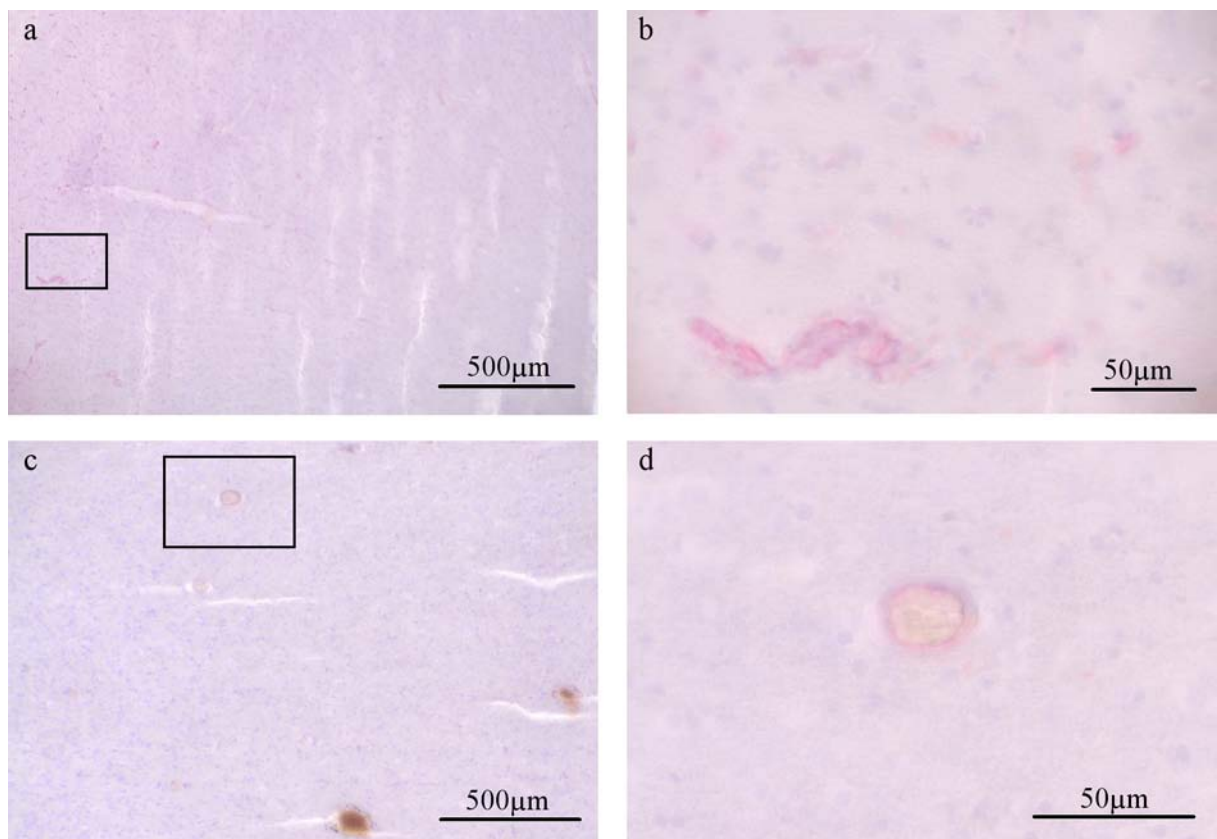
Der Median zeigt an, dass die mehrschichtigen und die einschichtigen Gefäße in der Mehrzahl der Fälle MMP-2-negativ waren. Nur bei wenigen Proben, die im Diagramm durch Sterne markiert sind, bestand eine MMP-2-Positivität der Gefäße. Signifikante Unterschiede zwischen den mehrschichtigen und den einschichtigen Gefäßen wurden im Wilcoxon-Test nicht beobachtet.

In einem nachfolgenden direkten Vergleich zwischen der MMP-2-Expressionsdichte mehrschichtiger und einschichtiger Gefäße der weißen Substanz zeigten sich im Wilcoxon-Test keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 16). Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorliegen eines signifikanten Unterschieds betrug 0,625. Die Referenzproben mit MMP-2-

positiven mehrschichtigen Gefäßen der weißen Substanz waren überwiegend mit denen identisch, deren einschichtige Gefäße in diesem Gewebebereich MMP-2-positiv waren. Das Diagramm in Abbildung 20 gibt einen Eindruck von der MMP-2-Expressionsdichte der Blutgefäße der weißen Substanz.

### **6.2.1.3 Vergleich zwischen der MMP-2-Expression grauer und weißer Substanz**

Zwischen der MMP-2-Expression der grauen und der weißen Substanz tumorfreier Referenzproben bestand abgesehen von den Blutgefäßen kein Unterschied. Beide Gewebe waren durchgängig negativ für das Antigen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorliegen eines signifikanten Fehlers betrug 1,000. Ein lichtmikroskopisches Beispiel der MMP-2-Expression des Referenzgewebes ist in Abbildung 21 dargestellt.



**Abbildung 21: Lichtmikroskopische MMP-2-Immunreaktivität der Referenzproben**

Abbildung (a) stellt die graue Substanz dar. Der in (a) markierte Ausschnitt ist in (b) vergrößert abgebildet. Abbildung (c) zeigt die weiße Substanz mit einer Vergrößerung des markierten Ausschnitts in Abbildung (d). Die Intensität der Rotfärbung spiegelt die MMP-2-Expression wider. Die graue Substanz enthält einschichtige Gefäße mit mäßig positiver MMP-2-Immunreaktivität. Das dargestellte einschichtige Gefäß der weißen Substanz in (d) zeigt eine schwach positive Färbung. Das übrige Gewebe der Referenzproben ist MMP-2-negativ.

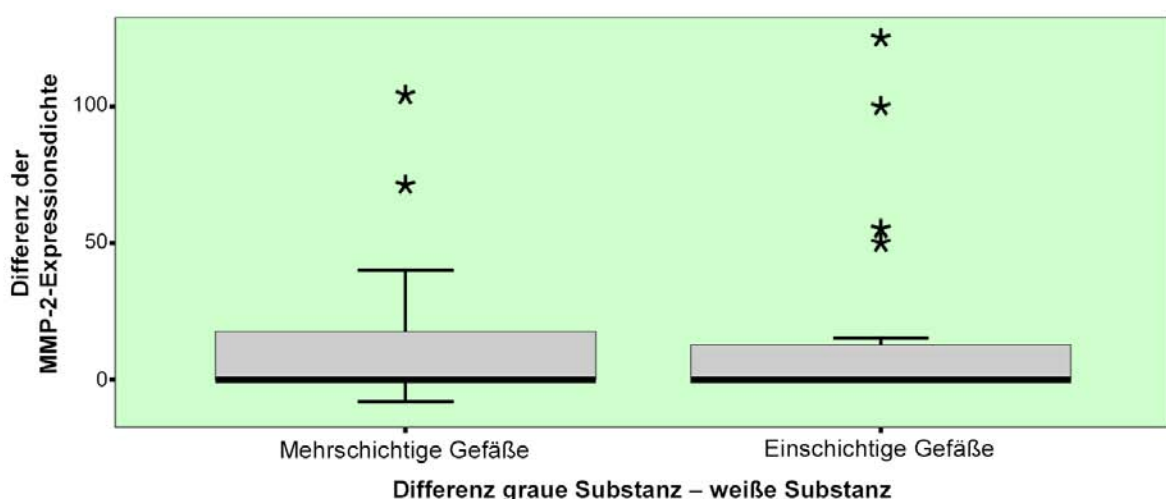
Auch die Blutgefäße in der grauen und der weißen Substanz waren in der Mehrzahl der Proben MMP-2-negativ. Dennoch wiesen mehrschichtige Gefäße in der grauen Substanz im direkten Vergleich eine signifikant höhere MMP-2-Expressionsdichte auf als die mehrschichtigen

Blutgefäße der weißen Substanz. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  betrug für dieses Ergebnis 0,020. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  von 0,016 war eine signifikant höhere MMP-2-Expressionsdichte mehrschichtiger Blutgefäße der grauen Substanz zu verzeichnen als der einschichtigen Gefäße der weißen Substanz. Analog zeigten die einschichtigen Gefäße der grauen Substanz eine höhere MMP-2-Expressionsdichte als die mehrschichtigen und einschichtigen Gefäße der weißen Substanz. Mit dem Wilcoxon-Test wurde gezeigt, dass die Unterschiede in beiden Fällen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  von 0,016 signifikant sind. (Tabelle 16). Das Diagramm in Abbildung 22 veranschaulicht das Ergebnis.

Es war zudem zu beobachten, dass alle Präparate mit MMP-2-positiven Blutgefäßen in der weißen Substanz auch eine MMP-2-Positivität in den mehrschichtigen und einschichtigen Gefäßen der grauen Substanz besaßen.

**Tabelle 16: Ergebnisse der statistischen Auswertung der MMP-2-Expressionsdichte der Referenzproben**  
Signifikante Unterschiede sind in der Tabelle orange unterlegt. Der angegebene Wert ist die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorliegen eines signifikanten Unterschieds.

	Graue Substanz	Mehrschichtige Gefäße graue Substanz	Einschichtige Gefäße graue Substanz	Mehrschichtige Gefäße weiße Substanz
Einschichtige Gefäße graue Substanz		0,646		
Weißer Substanz	1,000			
Mehrschichtige Gefäße weiße Substanz		0,020	0,016	
Einschichtige Gefäße weiße Substanz		0,016	0,016	0,625



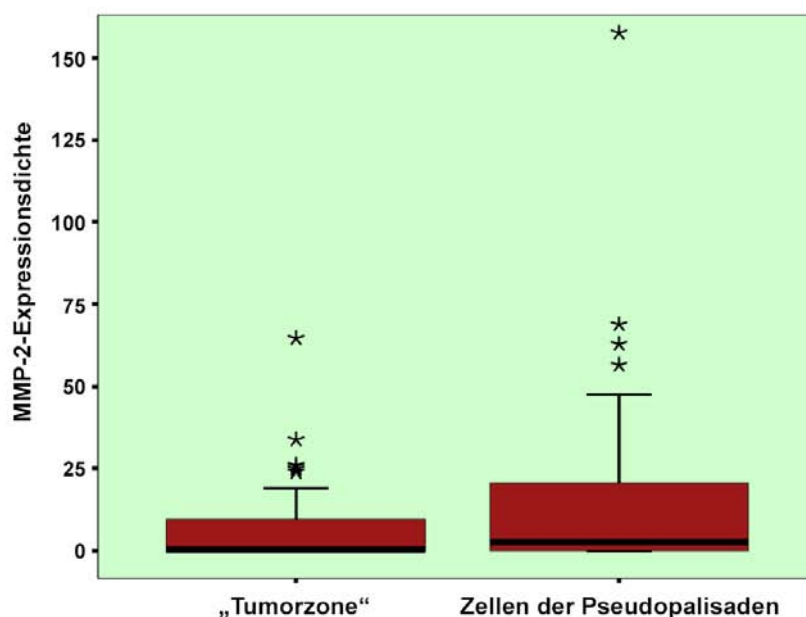
**Abbildung 22: Differenzen der MMP-2-Expressionsdichte der Blutgefäße grauer und weißer Substanz der Referenzproben.** Der Median (= 0) zeigt jeweils an, dass in der Mehrzahl der Referenzproben kein MMP-2-Expressionsunterschied zwischen den Blutgefäßen der grauen und der weißen Substanz bestand. Anhand der Ausstreckung des Boxplots in den positiven Bereich ist erkennbar, dass einige Proben deutlich höhere Expressionsdichtewerte in den Gefäßen der grauen Substanz als in denen der weißen Substanz aufwiesen. Der Unterschied war im Wilcoxon-Test sowohl für die mehrschichtigen als auch für die einschichtigen Gefäße statistisch signifikant. Die Sterne markieren Ausreißer.

## 6.2.2 MMP-2 in Glioblastomen

### 6.2.2.1 MMP-2-Expression der Tumorzone

Die Tumorzone exklusive Zellen der Pseudopalisaden und der Blutgefäße erwies sich in 50% der Glioblastomproben als MMP-2-positiv. Da das Antigen in den meisten Fällen relativ lokal begrenzt exprimiert wurde, lagen die Werte der MMP-2-Expressionsdichte in fast allen diesen Fällen im „niedrigen“ Bereich. Eine der 52 Proben zeigte eine „mittlere“ Expressionsdichte von MMP-2. Der Mittelwert und die einfache Standardabweichung der MMP-2-Expressionsdichte in der „Tumorzone“ betrugen  $6,86 \pm 11,98$  (Tabelle 17). Eine genauere Analyse der Glioblastomproben ergab, dass durchschnittlich 5% der Zellen der Tumorzone in Proben mit MMP-2-positiver „Tumorzone“ eine deutlich positive MMP-2-Immunreaktivität aufwiesen.

In 43 Tumorproben waren auch Pseudopalisaden Bestandteil der Tumor- und Nekrosezone. Für 56% dieser Glioblastome war eine MMP-2-Positivität der Zellen der Pseudopalisaden charakterisierend. Zwei der 43 Proben wiesen eine „mittlere“ MMP-2-Expressionsdichte dieses Gewebeanteils auf. Eine weitere Glioblastomprobe wurde durch eine „hohe“ MMP-2-Expressionsdichte der Zellen der Pseudopalisaden charakterisiert. Den übrigen 21 Proben mit MMP-2-positiven Zellen der Pseudopalisaden wurden „niedrige“ Werte der Antigenexpressionsdichte zugeordnet. Der Mittelwert und die einfache Standardabweichung der MMP-2-Expressionsdichte betrugen  $15,53 \pm 29,10$  (Tabelle 17). Einen Eindruck von den beschriebenen Ergebnissen vermittelt das Diagramm in Abbildung 23.



**Abbildung 23: MMP-2-Expressionsdichte der „Tumorzone“ und der Zellen der Pseudopalisaden**

Der Median zeigt an, dass die Tumorzone ohne Berücksichtigung der Zellen der Pseudopalisaden in vielen Fällen MMP-2-negativ war. In etwa der Hälfte der Proben bestand eine MMP-2-Positivität dieses Gewebeanteils. Mehr als die Hälfte der Glioblastome war in den Zellen der Pseudopalisaden MMP-2-positiv. Die MMP-2-Expressionsdichte MMP-2-positiver Proben war bei beiden Gewebeanteilen überwiegend im „niedrigen“ Bereich und nur vereinzelt darüber. Die Sterne markieren Ausreißer.



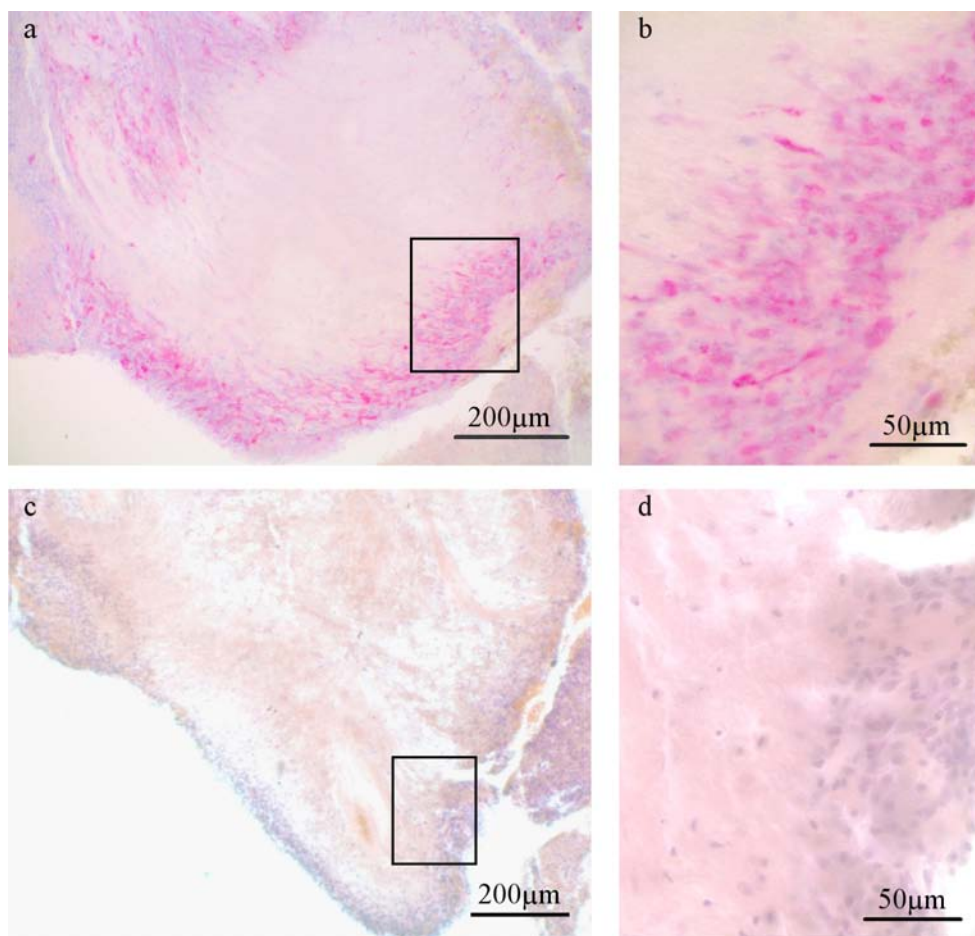
**Tabelle 17: MMP-2-Expressionsdichte der Glioblastomproben**

Angegeben sind der Mittelwert, die einfache Standardabweichung sowie der jeweils MMP-2-positive Probenanteil.

Gewebetyp	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	MMP-2-positiver Probenanteil
„Tumorzone“	6,86 $\pm$ 11,98	50%
Zellen der Pseudopalisaden	15,53 $\pm$ 29,10	56%
Invasionszone	4,64 $\pm$ 9,44	54%

Das Auftreten MMP-2-positiver Zellen in den Pseudopalisaden zeigte eine ausgeprägte lokale Häufung. Eine deutlich positive MMP-2-Immunreaktivität war in durchschnittlich 8% der Zellen von Pseudopalisaden MMP-2-positiver Glioblastome zu beobachten. Abbildung 24 zeigt die lichtmikroskopische Darstellung einer Nekrosezone mit Pseudopalisaden.

Die Glioblastomproben mit MMP-2-Positivität der „Tumorzone“ waren in vielen Fällen nicht mit denen identisch, deren Zellen der Pseudopalisaden sich als MMP-2-positiv erwiesen. Der Anteil der Glioblastomproben, der zumindest in einem der beiden Gewebeabteile MMP-2-positiv war, betrug 69%. 31% der Glioblastome erwiesen sich in der gesamten Tumorzone abgesehen von den Gefäßen als MMP-2-negativ.



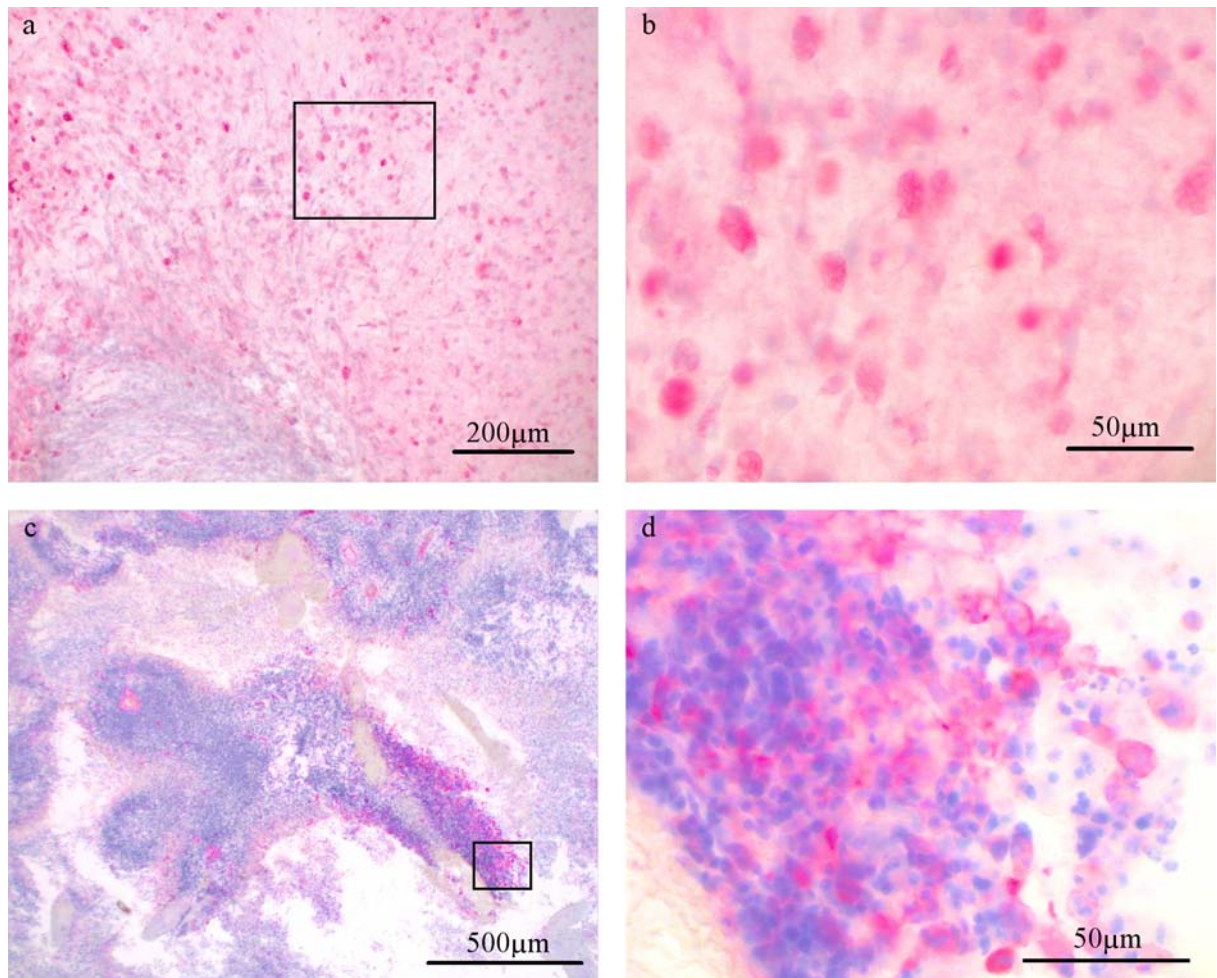
**Abbildung 24: Lichtmikroskopische Darstellung von Pseudopalisaden in einer Tumor- und Nekrosezone**

Die Abbildung (a) sowie die Vergrößerung des markierten Ausschnitts in Abbildung (b) sind in MMP-2-Immundetektion dargestellt. Die H/E-Färbung des entsprechenden Gewebes zeigt Abbildung (c). Der markierte Ausschnitt in (c) ist in Abbildung (d) vergrößert dargestellt. Die Zellen der Pseudopalisaden [palisadenförmig angeordnete Zellen am Geweberand in (a) und (c)] zeigen eine mäßige bis stark positive MMP-2-Immunreaktivität. Diese wird durch eine rötliche Zytoplasmafärbung gekennzeichnet.

Im Anschluss an die Expressionsanalyse wurde die MMP-2-Expressionsdichte der „Tumorzone“ exklusive Zellen der Pseudopalisaden und die der Zellen der Pseudopalisaden miteinander verglichen. Die MMP-2-Expressionsdichte der Gewebeanteile wurde im direkten Vergleich durch den Wilcoxon-Test auf signifikante Unterschiede geprüft.

In der deskriptiven Statistik zeigte sich ein geringfügiger Unterschied im Anteil MMP-2-positiver Proben beider Gewebeanteile. Bei einem Vergleich zwischen der MMP-2-Expressionsdichte der „Tumorzone“ und der Zellen der Pseudopalisaden waren keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen. Es war jedoch die Tendenz zu erkennen, dass die Zellen der Pseudopalisaden eine höhere MMP-2-Expressionsdichte aufwiesen als die „Tumorzone“. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  lag hierfür bei 0,072 (Tabelle 19).

Abbildung 25 zeigt die lichtmikroskopische Darstellung verschiedener Bereiche der Tumorzone einschließlich der Pseudopalisaden.



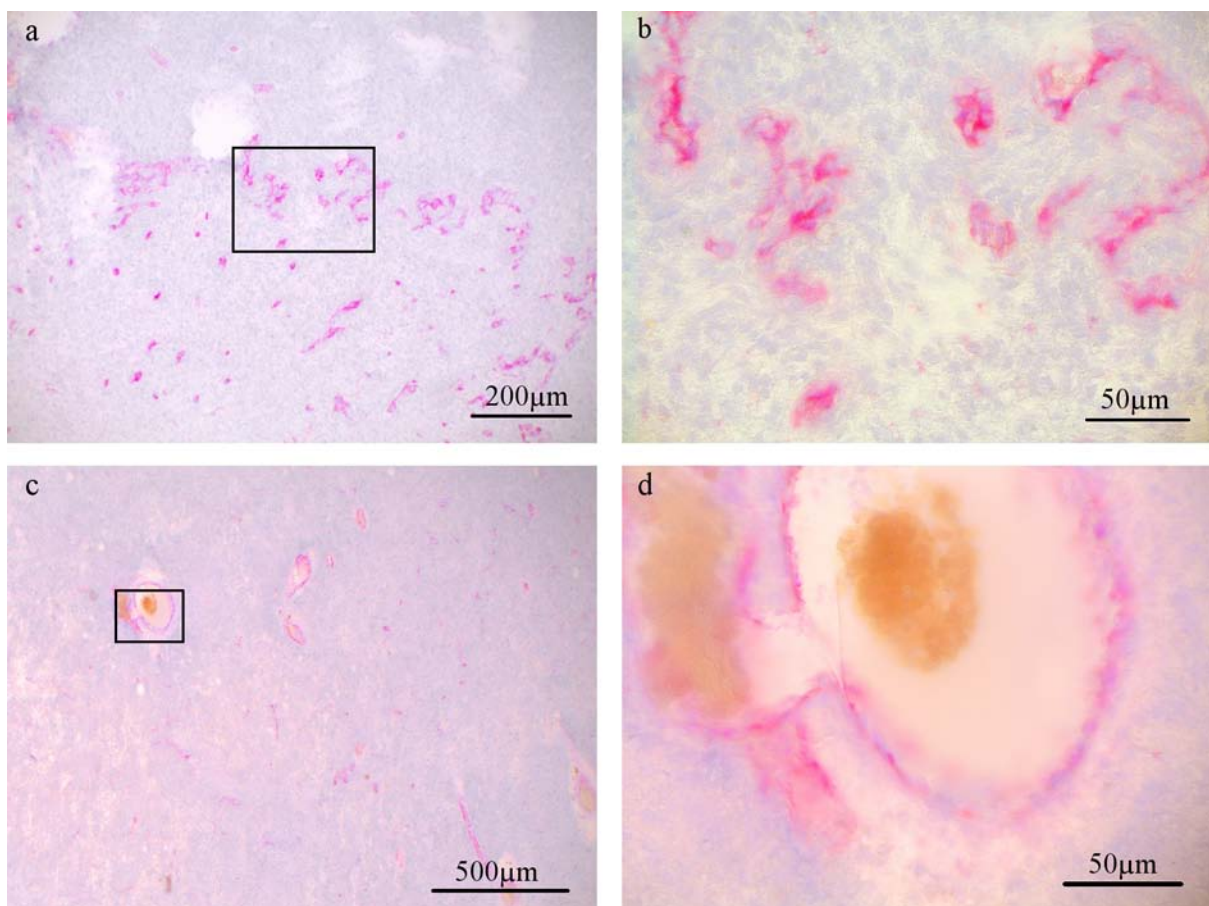
**Abbildung 25: Lichtmikroskopische Darstellung der MMP2-Expression in der Tumorzone**

Die Tumorzone in (a) zeigt anhand der rötlichen Zytoplasmafärbung eine teilweise stark positive MMP-2-Immunreaktivität. Der markierte Ausschnitt ist in Abbildung (b) vergrößert dargestellt. Abbildung (c) sowie die Vergrößerung des hier markierten Ausschnitts, die in (d) gezeigt wird, stellen Zellen der Pseudopalisaden am Rand einer Nekrosezone dar. Die MMP-2-Immunreaktivität dieser Zellen ist teilweise stark positiv und teilweise negativ.



Zusätzlich zu den bereits charakterisierten Gewebeanteilen wurden in der Tumorzone Blutgefäße bewertet. Mehrschichtige Blutgefäße waren hier in 90% der Glioblastome MMP-2-positiv. 10% der Proben wiesen MMP-2-Negativität dieser Gewebeanteile auf.

Die MMP-2-Expressionsdichte der mehrschichtigen Gefäße lag in 46% der Fälle im „mittleren“ Bereich. Eine „niedrige“ MMP-2-Expressionsdichte war in 32% der Proben auszumachen. 8% der Glioblastome waren durch eine „hohe“ Expressionsdichte des Antigens in den mehrschichtigen Blutgefäßen charakterisiert. Zwei der 52 Proben besaßen eine „sehr hohe“ Expressionsdichte des Antigens in diesem Gewebeanteil. Der Mittelwert und die einfache Standardabweichung der MMP-2-Expressionsdichte der mehrschichtigen Gefäße der Tumorzone betrugen  $70,48 \pm 73,20$  (Tabelle 18).



**Abbildung 26: Lichtmikroskopische MMP-2-Immunreaktivität der Blutgefäße der Tumorzone**

Die Abbildung (a) zeigt einschichtige Gefäße der Tumorzone mit stark positiver MMP-2-Immunreaktivität (rötliche Zytoplasmafärbung). Abbildung (b) stellt den in (a) markierten Ausschnitt vergrößert dar. Ein mehrschichtiges Gefäß der Tumorzone mit mäßiger bis stark positiver Immunreaktivität des Endothels ist in (c) abgebildet. Die Vergrößerung des hier markierten Ausschnitts befindet sich in Abbildung (d).

Einschichtige Blutgefäße der Tumorzone wiesen in 92% der Proben MMP-2-Positivität auf. Die Werte der MMP-2-Expressionsdichte lagen für diesen Gewebeanteil in 34% der Glioblastome im „mittleren“ und in 35% der Proben im „hohen“ Bereich. Eine „sehr hohe“ Expressionsdichte des Antigens war in den einschichtigen Gefäßen von drei der 52 Proben zu



verzeichnen. 15% der Tumorproben wiesen eine „niedrige“ MMP-2-Expressionsdichte dieses Gewebeanteils auf. Der Mittelwert und die einfache Standardabweichung der MMP-2-Expressionsdichte betrugen  $101,25 \pm 110,00$  (Tabelle 18).

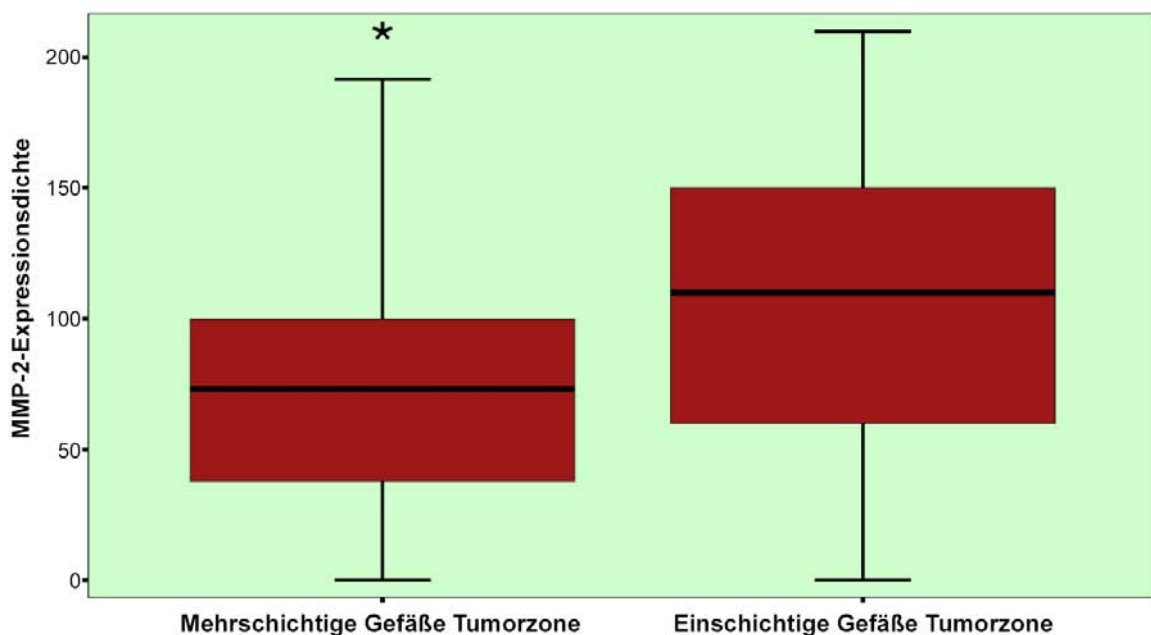
**Tabelle 18: MMP-2-Expressionsdichte der Blutgefäße in den Glioblastomproben**

Angegeben sind der Mittelwert, die einfache Standardabweichung sowie der jeweils MMP-2-positive Probenanteil.

Gewebetyp	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	MMP-2-positiver Probenanteil
Mehrschichtige Gefäße Tumorzone	70,48 $\pm$ 73,20	90%
Einschichtige Gefäße Tumorzone	101,25 $\pm$ 110,00	92%
Mehrschichtige Gefäße Invasionszone	66,54 $\pm$ 51,09	93%
Einschichtige Gefäße Invasionszone	99,07 $\pm$ 52,35	95%

Die Abbildung 26 zeigt lichtmikroskopische Beispiele MMP-2-positiver Gefäße der Tumorzone. Ein direkter Vergleich mehrschichtiger und einschichtiger Blutgefäße der Tumorzone hinsichtlich der MMP-2-Expressionsdichte ergab signifikant höhere Werte der einschichtigen Gefäße als der mehrschichtigen Gefäße. Mit dem Wilcoxon-Test wurde gezeigt, dass der Unterschied mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit p von weniger als 0,001 signifikant war (Tabelle 20).

Wesentliche Unterschiede hinsichtlich des Anteils von Glioblastomen mit MMP-2-Positivität beider Gewebeanteile bestanden nicht. Das Diagramm in Abbildung 27 veranschaulicht das beschriebene Ergebnis.

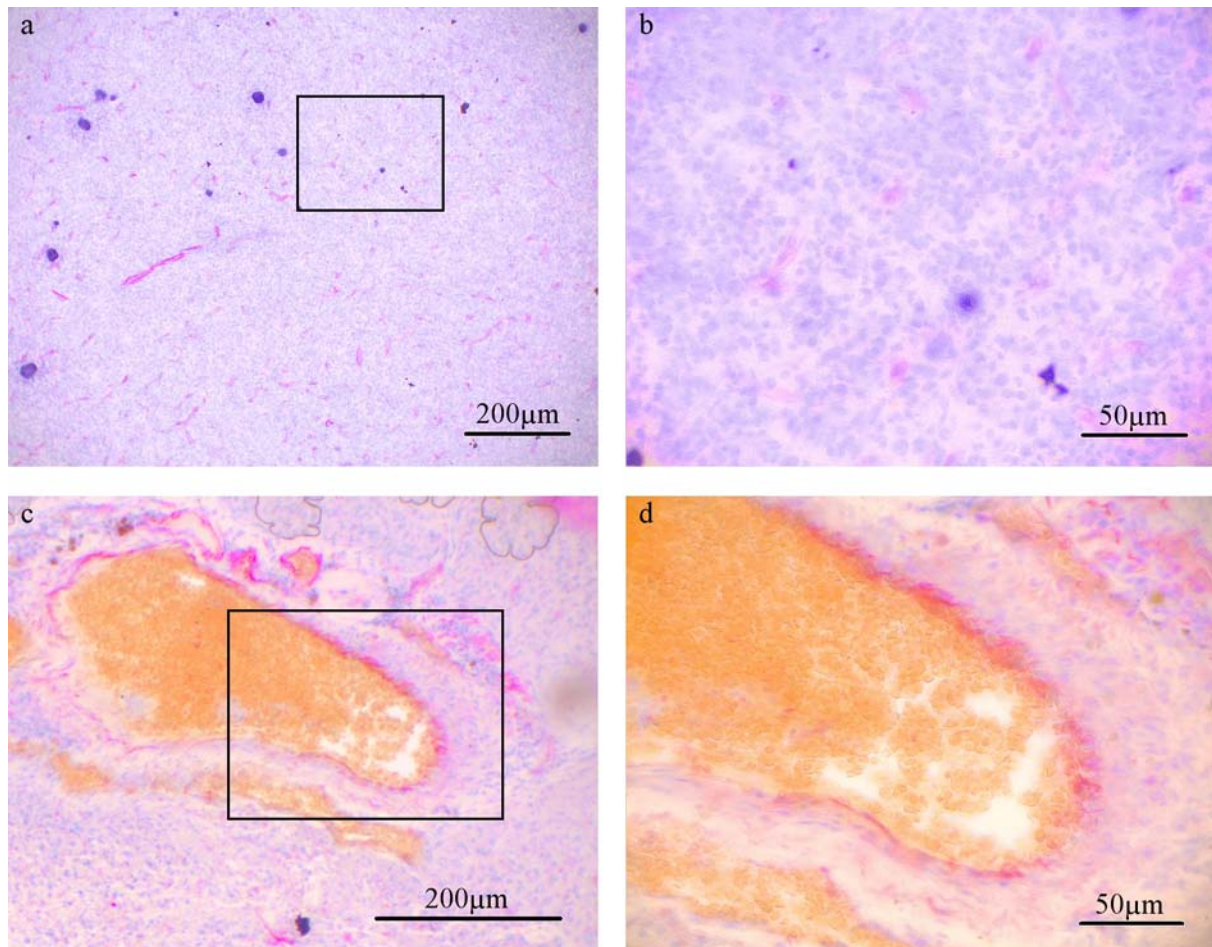


**Abbildung 27: MMP-2-Expressionsdichte der Blutgefäße der Tumorzone**

Der Median zeigt an, dass die mehrschichtigen und einschichtigen Gefäße in der Mehrzahl der Fälle eine deutliche MMP-2-Positivität aufwiesen. Die MMP-2-Expressionsdichte war in beiden Gewebeanteilen durchschnittlich im „mittleren“ Bereich. Der Wilcoxon-Test zeigte, dass die Werte bei den einschichtigen Gefäßen signifikant höher waren als bei den mehrschichtigen. Die Sterne markieren Ausreißer.

#### 6.2.2.2 MMP-2-Expression der Invasionszone

Von den 52 untersuchten Glioblastomen enthielten 43 Proben eine Invasionszone. Für die Invasionszone ohne Berücksichtigung der Gefäße war in 54% der Proben eine MMP-2-Positivität kennzeichnend. Die Expressionsdichte lag dabei in allen Fällen im „niedrigen“ Bereich. Etwa 3% der Zellen MMP-2-positiver Invasionszonen waren durch eine deutlich positive MMP-2-Immunreaktivität gekennzeichnet. Der Mittelwert und die einfache Standardabweichung der MMP-2-Immunreaktivität betrugen  $4,64 \pm 9,44$  (Tabelle 17).



**Abbildung 28: Lichtmikroskopische MMP-2-Immunreaktivität der Blutgefäße der Invasionszone**

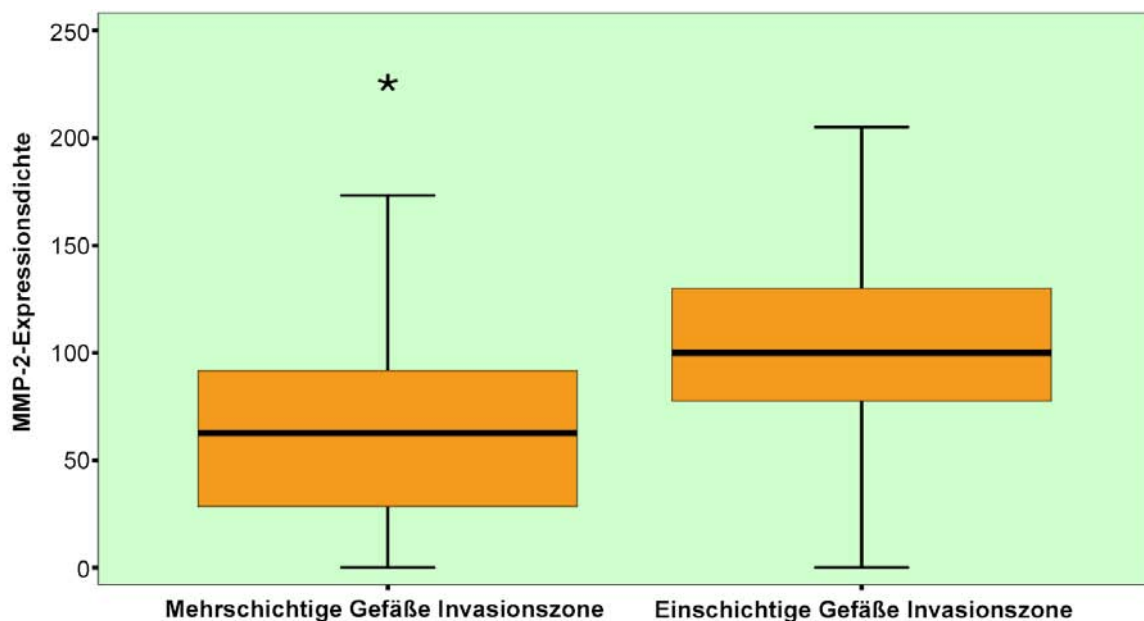
Abbildung (a) zeigt einschichtige Gefäße der Invasionszone mit einer mäßig positiven MMP-2-Immunreaktivität, die durch eine rötliche Zytoplasmafärbung angezeigt wird. Der in (a) markierte Ausschnitt ist in Abbildung (b) vergrößert dargestellt. (c) bildet ein mehrschichtiges Gefäß mit mäßiger bis stark positiver Immunreaktivität ab. (d) ist die Vergrößerung des in (c) markierten Ausschnitts. Das übrige Gewebe der Invasionszone ist in allen Abbildungen weitgehend MMP-2-negativ.

Neben dem eigentlichen Gewebe wurden in der Invasionszone die Blutgefäße bezüglich ihrer MMP-2-Expression bewertet. Es zeigte sich, dass 93% der Proben MMP-2-Positivität der mehrschichtigen Gefäße aufwiesen. Die Werte der Antigenexpressionsdichte lagen in 42% der Fälle im „niedrigen“ Bereich. In 33% der Proben wurde diesem Gewebeanteil eine „mittlere“ Expressionsdichte zugeordnet. Die übrigen 18% wurden - abgesehen von einem Fall mit „sehr hoher“ Expressionsdichte - in den Bereich einer „hohen“ MMP-2-Expressionsdichte

mehrschichtiger Blutgefäße eingestuft. Der Mittelwert der Expressionsdichte und die einfache Standardabweichung betrugen  $66,54 \pm 51,09$  (Tabelle 18).

MMP-2-Positivität der einschichtigen Gefäße der Invasionszone wiesen 95% der Proben mit einer Invasionszone auf. Die Werte der Expressionsdichte befanden sich zu 44% im „mittleren“ und zu 32% der Proben im „hohen“ Bereich. Eine „sehr hohe“ Expressionsdichte einschichtiger Gefäße der Invasionszone wurde in zwei der 43 Proben ausgemacht. Die übrigen 15% der Proben wurden durch „niedrige“ Werte der MMP-2-Expressionsdichte dieses Gewebeanteils charakterisiert. Der Mittelwert und die einfache Standardabweichung der MMP-2-Expressionsdichte einschichtiger Blutgefäße betrugen  $99,07 \pm 52,35$  (Tabelle 18). Eine lichtmikroskopische Darstellung der Gefäße der Invasionszone zeigt Abbildung 28.

In einem Vergleich der MMP-2-Expression mehrschichtiger und einschichtiger Gefäße der Invasionszone wurde mit dem Wilcoxon-Test geprüft, ob signifikante Unterschiede vorlagen. Es zeigte sich eine signifikant höhere MMP-2-Expressionsdichte einschichtiger Gefäße als die mehrschichtiger Gefäße. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  war für dieses Ergebnis kleiner als 0,001 (Tabelle 20). Das Diagramm in Abbildung 29 veranschaulicht dieses Ergebnis.



**Abbildung 29: MMP-2-Expressionsdichte der Blutgefäße der Invasionszone**

Der Median zeigt jeweils an, dass die mehrschichtigen und einschichtigen Gefäße in der Mehrzahl der Fälle eine deutliche MMP-2-Positivität aufwiesen. Die MMP-2-Expressionsdichte war in beiden Gewebeanteilen durchschnittlich im „mittleren“ Bereich. Der Wilcoxon-Test zeigte, dass die Werte bei den einschichtigen Gefäßen signifikant höher waren als bei den mehrschichtigen. Die Sterne markieren Ausreißer.

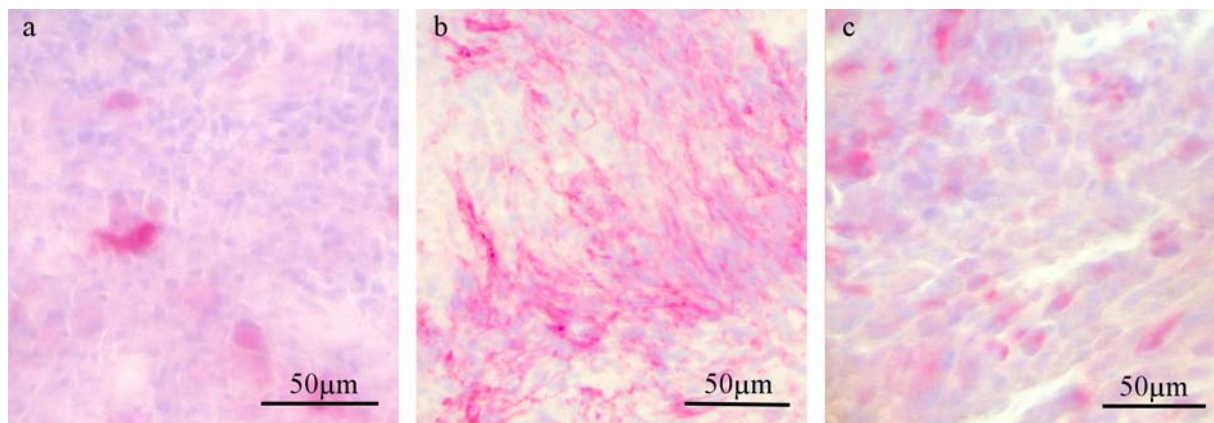
### 6.2.2.3 Vergleich zwischen der MMP-2-Expression der Tumor- und der Invasionszone

Bei dem Vergleich der MMP-2 Expression von Tumorzone und Invasionszone wurden zunächst die „Tumorzone“ exklusive Zellen der Pseudopalisaden, die Zellen der Pseudopalisaden und die Invasionszone ohne Berücksichtigung der Blutgefäße

gegenübergestellt. Unterschiede zwischen der MMP-2-Expressionsdichte „Tumorzone“ und der Invasionszone zeigten sich im direkten Vergleich durch den Wilcoxon-Test als nicht signifikant. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorliegen eines signifikanten Unterschieds betrug 0,481 (Tabelle 19). Die Zellen der Pseudopalisaden hatten hingegen signifikant höhere Werte der Expressionsdichte von MMP-2 als die Invasionszone. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  betrug für dieses Ergebnis 0,048 (Tabelle 19). Die lichtmikroskopische Darstellung in Abbildung 30 veranschaulicht das beschriebene Ergebnis.

**Tabelle 19: Ergebnisse der statistischen Auswertung der MMP-2-Expressionsdichte der Glioblastomproben**  
Signifikante Unterschiede sind in der Tabelle orange unterlegt. Der angegebene Wert ist die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorliegen eines signifikanten Unterschieds.

	„Tumorzone“	Zellen der Pseudopalisaden
Zellen der Pseudopalisaden	0,072	
Invasionszone	0,481	0,048



**Abbildung 30: Lichtmikroskopische Darstellung der MMP-2 Expression in Glioblastomen**

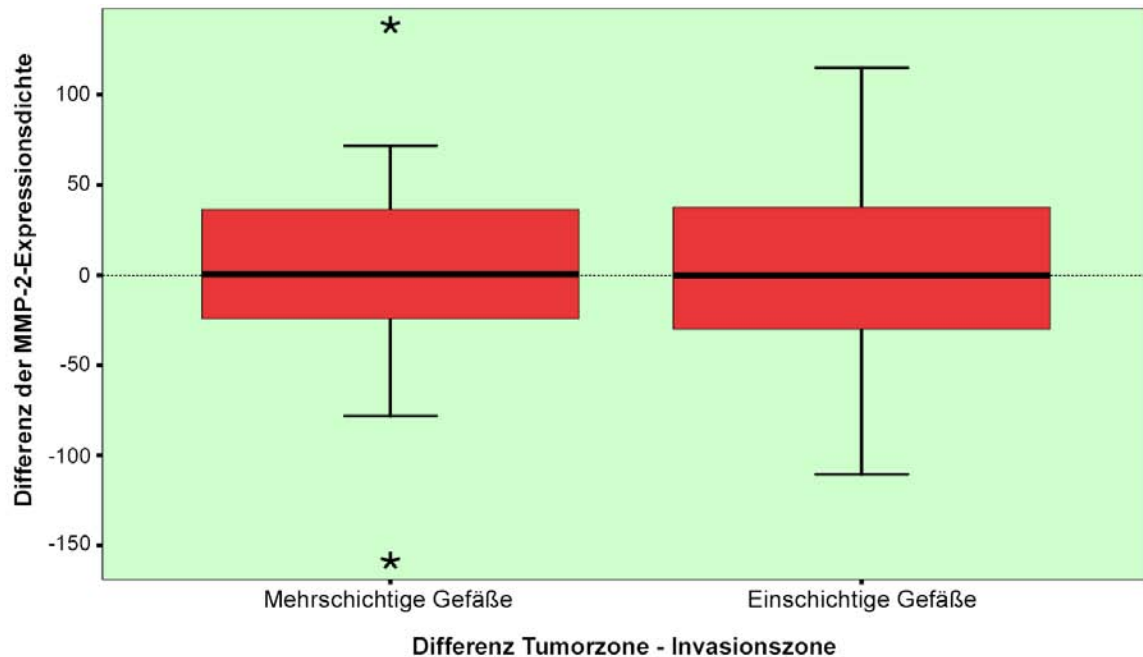
Abbildung (a) stellt die „Tumorzone“, (b) die Zellen der Pseudopalisaden und (c) die Invasionszone dar. Die unterschiedliche MMP-2-Immunreaktivität ist durch die rötliche Zytoplasmafärbung gekennzeichnet. Die Immunreaktivität der Zellen der Pseudopalisaden erwies sich als signifikant stärker als die der Invasionszone.

Die MMP-2-Expressionsdichte der Blutgefäße von Tumorzone und Invasionszone wurde mit dem Wilcoxon-Test in einem direkten Vergleich auf signifikante Unterschiede geprüft. Zwischen den mehrschichtigen Gefäßen der Tumor- und der Invasionszone bestanden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der MMP-2-Expressionsdichte. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorliegen eines signifikanten Unterschieds betrug 0,529. Gleiches galt für die einschichtigen Gefäße beider Zonen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,706. Signifikant höhere Werte waren mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  von weniger als 0,001 bei den einschichtigen Gefäßen der Tumorzone gegenüber den mehrschichtigen Gefäßen der Invasionszone zu verzeichnen. Die MMP-2-Expressionsdichte einschichtiger Blutgefäße der Invasionszone lag mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 0,001 über der mehrschichtiger Gefäße der Tumorzone. Die Tabelle 20 sowie das Diagramm in Abbildung 31 spiegeln dieses Ergebnis wider.



**Tabelle 20: Ergebnisse der statistischen Auswertung der MMP-2-Expressionsdichte der Gefäße in Glioblastomproben.** Signifikante Unterschiede sind in der Tabelle orange unterlegt. Der angegebene Wert ist die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorliegen eines signifikanten Unterschieds.

	Mehrschichtige Gefäße Tumorzone	Einschichtige Gefäße Tumorzone	Mehrschichtige Gefäße Invasionszone
Einschichtige Gefäße Tumorzone	< 0,001		
Mehrschichtige Gefäße Invasionszone	0,529	< 0,001	
Einschichtige Gefäße Invasionszone	< 0,001	0,706	< 0,001



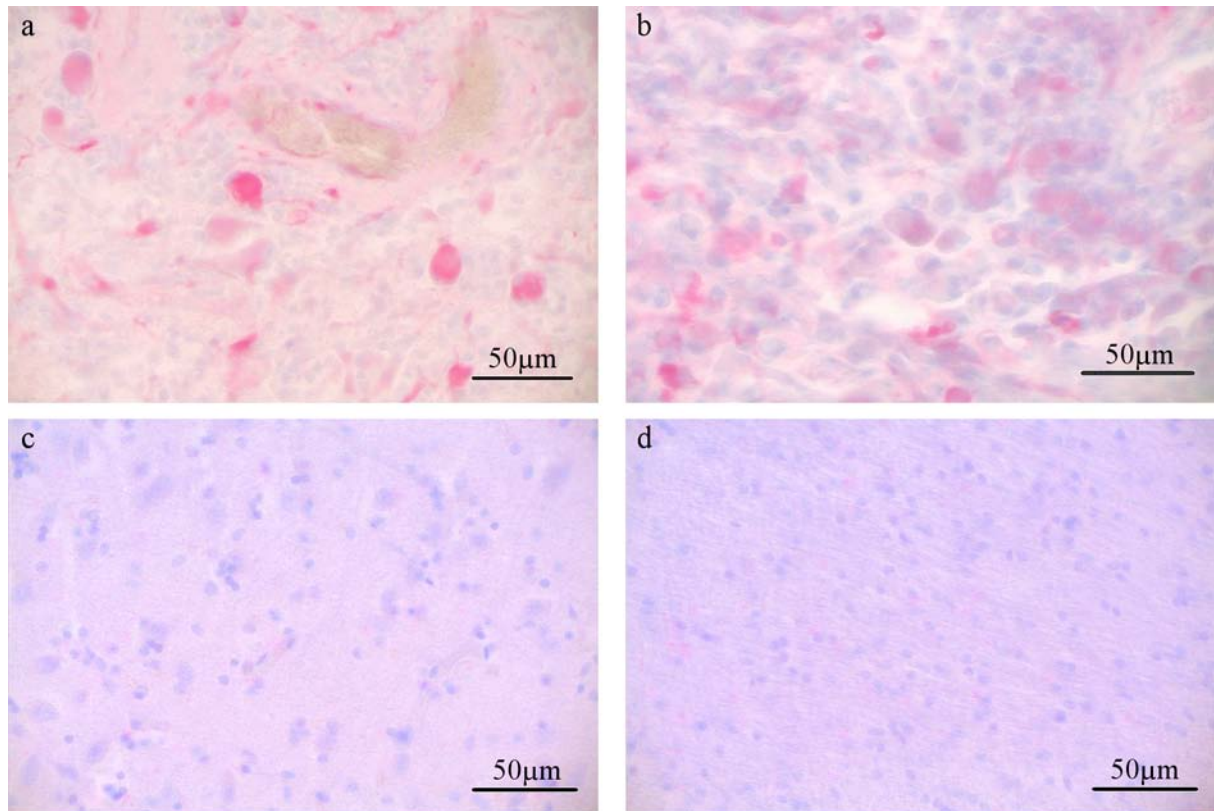
**Abbildung 31: Differenzen der MMP-2-Expressionsdichte der Blutgefäße von Tumorzone und Invasionszone der jeweils gleichen Tumorprobe.** Der Median ist sowohl bei den mehrschichtigen als auch bei den einschichtigen Gefäßen jeweils bei Null, während sich die übrigen Werte der Differenzen relativ symmetrisch um den Nullpunkt anordnen. Dies veranschaulicht, dass keine signifikanten MMP-2-Expressionsunterschiede zwischen den mehrschichtigen Gefäßen bzw. zwischen den einschichtigen Gefäßen beider Zonen bestanden, wie im Wilcoxon-Test nachgewiesen werden konnte.

### 6.2.3 MMP-2-Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Referenzproben

Das eigentliche Gewebe der Referenzproben erwies sich, wie in Abschnitt 6.2.1 beschrieben, als durchgängig negativ für MMP-2. Dagegen war in jeweils etwa der Hälfte der Glioblastome eine MMP-2-Positivität der „Tumorzone“, der Zellen der Pseudopalisaden bzw. der Invasionszone zu verzeichnen, insofern man Blutgefäße zunächst unberücksichtigt ließ. Die MMP-2-Expressionsdichte wurde mit dem Mann-Whitney-Test auf signifikante Unterschiede geprüft. Dabei zeigte sich, dass sowohl die „Tumorzone“ exklusive Zellen der Pseudopalisaden als auch die Zellen der Pseudopalisaden jeweils signifikant höhere Werte der MMP-2-Expressionsdichte aufwiesen als die graue und weiße Substanz des Referenzgewebes. Ebenso war die MMP-2-Expressionsdichte der Invasionszone signifikant höher als die der grauen und weißen Substanz der Referenzproben. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  war für jedes der genannten Ergebnisse kleiner als 0,001 (Tabelle 21). Die lichtmikroskopische Darstellung von Tumor- und Referenzgewebe in Abbildung 32 veranschaulicht das Ergebnis.

**Tabelle 21: Ergebnisse der statistischen Auswertung der MMP-2-Expressionsdichte von Glioblastom- und Referenzproben.** Signifikante Unterschiede sind in der Tabelle orange unterlegt. Der angegebene Wert ist die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorliegen eines signifikanten Unterschieds.

	„Tumorzone“	Zellen der Pseudopalisaden	Invasionszone
Graue Substanz	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Weißer Substanz	< 0,001	< 0,001	< 0,001



**Abbildung 32: Lichtmikroskopische MMP-2-Immunreaktivität von Glioblastom- und Referenzproben**

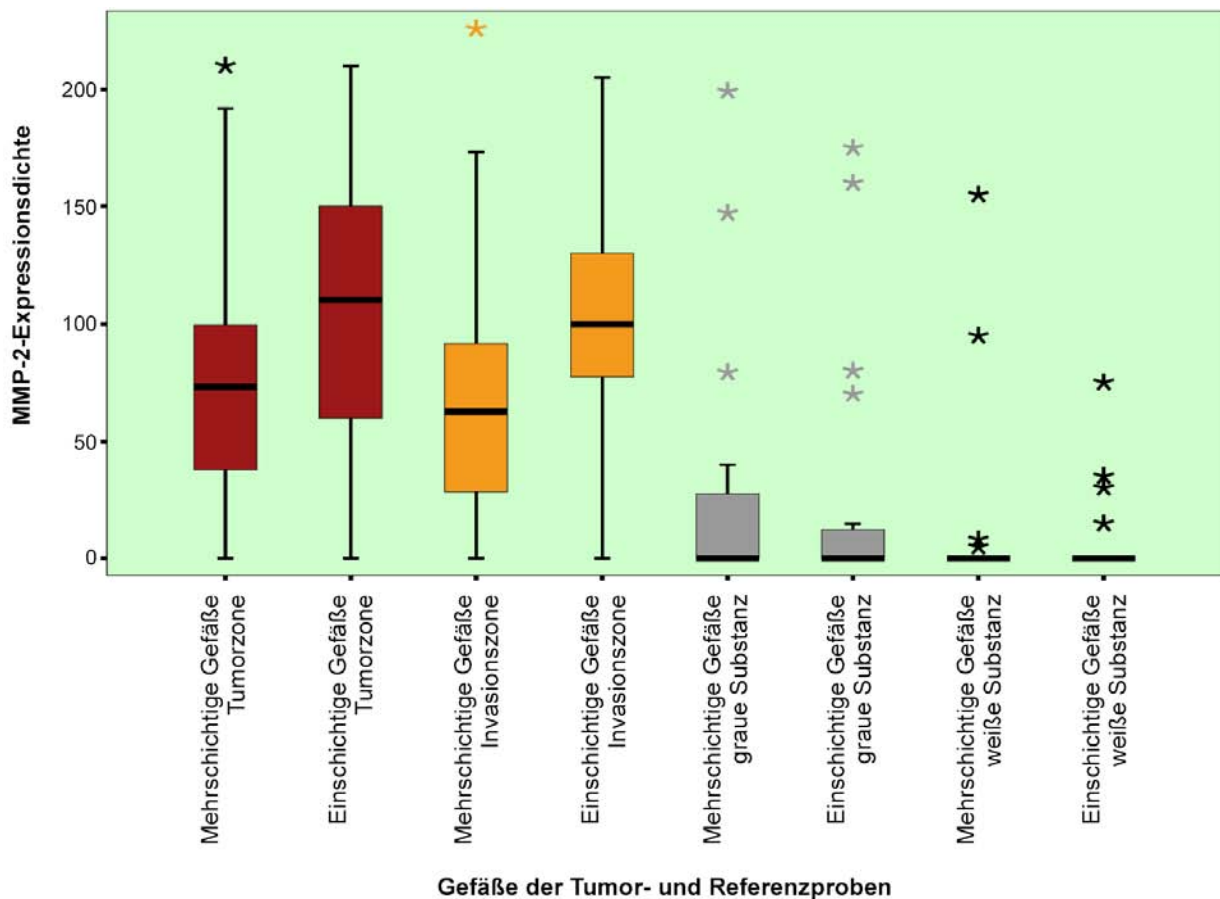
Abbildung (a) zeigt die Tumorzone, (b) die Invasionszone, (c) die graue Substanz der Referenzproben und (d) die weiße Substanz der Referenzproben. Anhand der rötlichen Zytoplasmafärbung ist erkennbar, dass die Tumor- und die Invasionszone deutlich MMP-2-positiv sind. Demgegenüber weist das tumorfremde Gewebe der Referenzproben MMP-2-Negativität auf.

Nachfolgend wurde zwischen der MMP-2-Expression der Blutgefäße von Referenz- und Tumorproben verglichen. MMP-2-Positivität konnte nicht nur in Glioblastomproben sondern teilweise auch in den mehrschichtigen und einschichtigen Gefäßen der tumorfremden Referenzproben beobachtet werden. Dennoch waren die Gefäße der grauen und weißen Substanz des Referenzgewebes in einem deutlich geringeren Probenanteil MMP-2-positiv als die entsprechenden Gewebeanteile der Tumorproben. Unterschiede ergaben sich zudem bei der Höhe der Expressionsdichte MMP-2-positiver Proben. Eine Überprüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test. Es zeigte sich eine signifikant höhere MMP-2-Expression mehrschichtiger und einschichtiger Gefäße der Tumorzone gegenüber den entsprechenden Gefäßen grauer und weißer Substanz der Referenzproben. Analog war die MMP-2-Expressionsdichte mehrschichtiger und einschichtiger Gefäße der Invasionszone

signifikant höher als die der Gefäße in der grauen und weißen Substanz der tumorfreien Proben. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  war für alle in diesem Abschnitt beschriebenen Ergebnisse jeweils kleiner als 0,001 (Tabelle 22). Das Diagramm in Abbildung 33 vermittelt einen Eindruck von dem Ergebnis.

**Tabelle 22: Ergebnisse der statistischen Auswertung der MMP-2-Expressionsdichte der Gefäße in Glioblastom- und Referenzproben.** Signifikante Unterschiede sind in der Tabelle orange unterlegt. Der angegebene Wert ist die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorliegen eines signifikanten Unterschieds.

	Mehrschichtige Gefäße Tumorzone	Einschichtige Gefäße Tumorzone	Mehrschichtige Gefäße Invasionszone	Einschichtige Gefäße Invasionszone
Mehrschichtige Gefäße graue Substanz	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Einschichtige Gefäße graue Substanz	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Mehrschichtige Gefäße weiße Substanz	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Einschichtige Gefäße weiße Substanz	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001



**Abbildung 33: MMP-2-Expressionsdichte der Blutgefäße von Glioblastomproben und Referenzproben**

Das Diagramm zeigt, dass die MMP-2-Expressionsdichte der Gefäße der Tumor- und der Invasionszone deutlich über der der Gefäße der grauen und weißen Substanz lag. Dies galt sowohl für die mehrschichtigen als auch für die einschichtigen Gefäße. Die Unterschiede waren im Mann-Whitney-Test statistisch signifikant. Die Sterne markieren Ausreißer.

#### **6.2.4 Darstellung der wichtigsten Ergebnisse der MMP-2-Expressionsanalyse**

Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse der Kapitel 6.2.1 bis 6.2.3 zusammengefasst. Die lichtmikroskopische Auswertung des tumorfreien Referenzgewebes zeigte abgesehen von den Blutgefäßen eine durchgängige MMP-2-Negativität der grauen und der weißen Substanz. Blutgefäße waren in 20 bis 50% der Referenzproben MMP-2-positiv. Zwischen den mehrschichtigen und den einschichtigen Gefäßen der grauen Substanz bzw. zwischen denen der weißen Substanz bestanden keine signifikanten Unterschiede. Die Blutgefäße der grauen Substanz wiesen eine signifikant stärkere MMP-2-Expression auf als die der weißen Substanz. Das Gewebe des Tumors zeigte sowohl in der Tumorzone als auch in der Invasionszone eine signifikant stärkere MMP-2-Expression als die Referenzproben. MMP-2-positive Zellen traten mit deutlicher lokaler Häufung auf. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Tumorzone ohne Berücksichtigung der Pseudopalisaden und den Zellen der Pseudopalisaden bestand nicht. Gegenüber der Invasionszone zeigte die Tumorzone ebenfalls keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der MMP-2-Expression. Die Zellen der Pseudopalisaden wiesen eine signifikant stärkere MMP-2-Expression auf als die Invasionszone.

Blutgefäße waren in 90 bis 95% der Glioblastomproben MMP-2-positiv. Die MMP-2-Expression war in den Gefäßen der Tumorproben signifikant höher als in denen des Referenzgewebes. Einschichtige Blutgefäße zeigten sowohl in der Tumorzone als auch in der Invasionszone eine signifikant höhere MMP-2-Expressionsdichte als die mehrschichtigen Gefäße. Zwischen den einschichtigen Gefäßen der Tumorzone und der Invasionszone bestanden keine signifikanten Unterschiede. Gleiches galt für die mehrschichtigen Gefäße beider Areale.



### **6.3 Expression von Faktor X**

Die gegen Faktor X gefärbten Proben wurden lichtmikroskopisch ausgewertet. Eine makroskopische Beurteilung erfolgte nicht, da das Antigen mit lokaler Häufung, nicht jedoch mit weiträumiger Verteilung auftrat.

Bei der Analyse der Referenzproben wurde zwischen grauer und weißer Substanz unterschieden. Zusätzlich zu dem eigentlichen Gewebe wurden jeweils mehrschichtige und einschichtige Gefäße bewertet.

Innerhalb der Glioblastomproben erfolgte eine getrennte Untersuchung der Tumorzone und der Invasionszone. In der Tumorzone wurde zunächst die Tumorzone exklusive Zellen der Pseudopalisaden beurteilt. Dieser Gewebeanteil wird im folgenden auch als „Tumorzone“ bezeichnet. Als weitere Gewebeanteile wurden Zellen der Pseudopalisaden am Rand von Nekrosezonen sowie einschichtige und mehrschichtige Blutgefäße der Tumorzone separat analysiert. Bei der Invasionszone wurde zunächst das Gewebe exklusive Gefäßen bewertet. Daneben wurde bei der Auswertung zwischen mehrschichtigen und einschichtigen Gefäßen unterschieden.

Die Blutgefäße wiesen meist nur in den Endothelzellen eine positive Immunreaktivität auf. Daher wurden nur diese Zellen in die Untersuchung der Gefäße einbezogen.

#### **6.3.1 Faktor X in den Referenzproben**

##### ***6.3.1.1 Faktor-X-Expression der grauen Substanz***

Die graue Substanz des tumorfreien Referenzgewebes zeigte sich in 58% der Proben als negativ für Faktor X. 42% der Proben wiesen eine „niedrige“ Expressionsdichte des Antigens auf. Der Mittelwert und die einfache Standardabweichung der Faktor-X-Expressionsdichte betrugen  $3,65 \pm 5,25$ .

Mehrschichtige Blutgefäße innerhalb der grauen Substanz waren in 95% der Proben durch Faktor-X-Negativität gekennzeichnet. Nur eine der 19 Proben war durch eine „niedrige“ Faktor-X-Expressionsdichte dieses Gewebeanteils charakterisiert. Der Mittelwert und die Standardabweichung der Faktor-X-Expressionsdichte betrugen  $0,26 \pm 1,15$ .

Einschichtige Gefäße der grauen Substanz erwiesen sich in allen Fällen als Faktor-X-negativ. Der Mittelwert und die Standardabweichung betrugen  $0,00 \pm 0,00$  (Tabelle 23).

Der geringe Unterschied zwischen der Faktor-X-Expression der großen und der kleinen Gefäße zeigte sich im direkten Vergleich durch den Wilcoxon-Test als nicht signifikant. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p für das Vorliegen eines signifikanten Unterschieds betrug etwa 1,000 (Tabelle 24).

**Tabelle 23: Faktor-X-Expressionsdichte der Referenzproben**

Angegeben sind der Mittelwert, die einfache Standardabweichung sowie der jeweils Faktor-X-positive Probenanteil.

Gewebetyp	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	Faktor-X-positiver Probenanteil
Graue Substanz	3,65 $\pm$ 5,25	42%
Mehrschichtige Gefäße grauer Substanz	0,26 $\pm$ 1,15	5%
Einschichtige Gefäße grauer Substanz	0,00 $\pm$ 0,00	0%
Weißer Substanz	2,64 $\pm$ 5,29	26%
Mehrschichtige Gefäße weißer Substanz	0,23 $\pm$ 1,00	5%
Mehrschichtige Gefäße weißer Substanz	0,00 $\pm$ 0,00	0%

### 6.3.1.2 Faktor-X-Expression der weißen Substanz

Eine Analyse des Gewebes der weißen Substanz ergab für 74% der Proben eine durchgängige Faktor-X-Negativität. In fünf der 19 Proben war eine „niedrige“ Faktor-X-Expressionsdichte dieser Gewebeanteile zu verzeichnen. Der Mittelwert und die einfache Standardabweichung der Faktor-X-Expressionsdichte betrugen  $2,64 \pm 5,29$ .

Die mehrschichtigen Blutgefäße der weißen Substanz waren in 95% der Referenzproben durch Faktor-X-Negativität charakterisiert. Eine der 19 Proben wies eine „niedrige“ Faktor-X-Expressionsdichte dieses Gewebeanteils auf. Der Mittelwert und die Standardabweichung betrugen  $0,23 \pm 1,00$ .

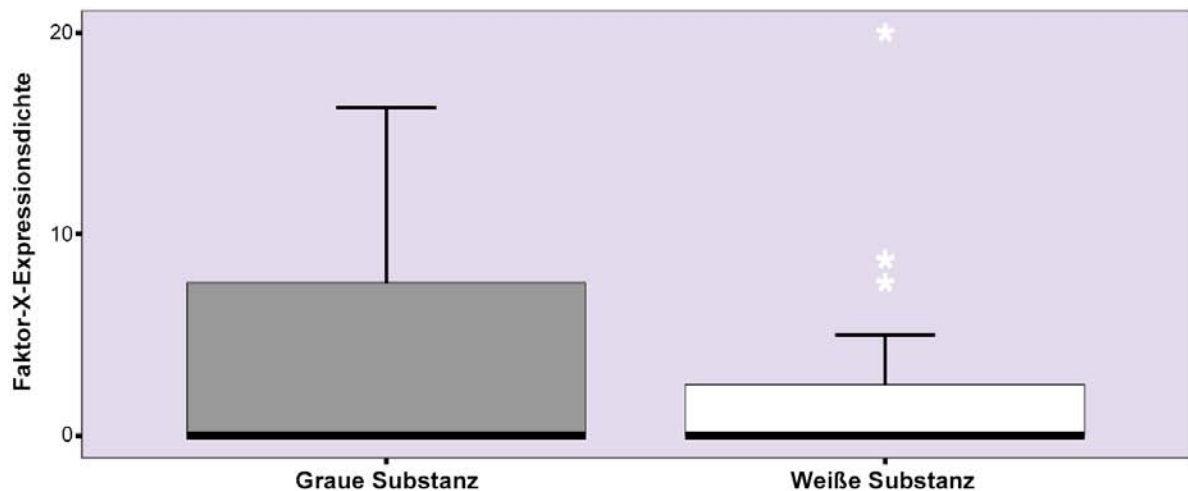
Einschichtige Blutgefäße der weißen Substanz waren durchgängig Faktor-X-negativ. Der Mittelwert und die Standardabweichung der Faktor-X-Expressionsdichte betrugen  $0,00 \pm 0,00$  (Tabelle 23).

Ein Vergleich zwischen der Faktor-X-Expression mehrschichtiger und einschichtiger Blutgefäße der weißen Substanz erbrachte nur einen geringfügigen Unterschied. Dieser zeigte sich im Wilcoxon-Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  von etwa 1,000 als nicht signifikant (Tabelle 24).

### 6.3.1.3 Vergleich zwischen der Faktor-X-Expression grauer und weißer Substanz

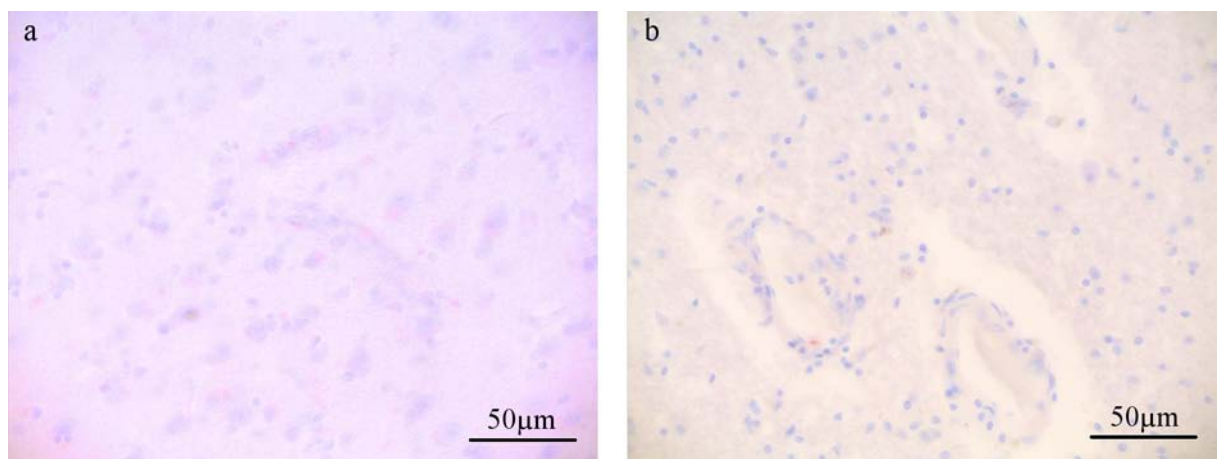
Der Anteil von Proben mit durchgängig Faktor-X-negativer weißer Substanz war höher als der mit Faktor-X-negativer grauer Substanz. Proben mit positiver Immunreaktivität innerhalb der weißen Substanz wiesen eine solche meist auch innerhalb der grauen Substanz auf. Die Expressionsdichte Faktor-X-positiver Proben lag sowohl für die graue Substanz als auch für die weiße Substanz im Bereich einer „niedrigen“ Expressionsdichte. Ein direkter Vergleich der beiden Gewebe mit dem Wilcoxon-Test erbrachte keine signifikanten Unterschiede. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorliegen eines signifikanten Unterschieds betrug 0,625

(Tabelle 24). Das Diagramm in Abbildung 34 sowie die lichtmikroskopische Darstellung in Abbildung 35 veranschaulichen dieses Ergebnis.



**Abbildung 34: Faktor-X-Expressionsdichte der grauen und weißen Substanz der Referenzproben**

Der Median liegt in beiden Fällen bei Null und zeigt an, dass die Mehrzahl der Proben in diesen Gewebeanteilen Faktor-X-negativ ist. Die Expressionsdichte Faktor-X-positiver Proben im Bereich der grauen und weißen Substanz liegt jeweils im „niedrigen“ Bereich. Signifikante Unterschiede zwischen grauer und weißer Substanz wurden im Wilcoxon-Test nicht nachgewiesen. Die Sterne markieren Ausreißer.



**Abbildung 35: Lichtmikroskopische Darstellung der Faktor-X-Immunreaktivität der Referenzproben.**

Die graue Substanz in (a) zeigt einzelne Zellen mit schwach positiver Immunreaktivität, die durch eine rötliche Zytoplasmafärbung sichtbar wird. Die dargestellte weiße Substanz in (b) ist Faktor-X-negativ. Die bläuliche Färbung der Zellkerne ist durch die Anfärbung mit Hämatoxylin bedingt.

Ein Vergleich der mehrschichtigen Blutgefäße des Referenzgewebes zeigte, dass bis auf jeweils einen Fall alle Referenzproben in der grauen und in der weißen Substanz in diesem Gewebeanteil Faktor-X-negativ waren. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  von etwa 1,000 waren im Wilcoxon-Test keine signifikanten Expressionsunterschiede auszumachen. Zwischen der Faktor-X-Expression der einschichtigen Gefäße in grauer bzw. weißer Substanz bestanden bei durchgängiger Faktor-X-Negativität keinerlei Unterschiede. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorliegen eines signifikanten Unterschieds betrug 1,000 (Tabelle 24).

**Tabelle 24: Ergebnisse der statistischen Auswertung der Faktor-X-Expressionsdichte der Referenzproben**  
Signifikante Unterschiede wurden nicht beobachtet. Der angegebene Wert ist die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorliegen eines signifikanten Unterschieds.

	Graue Substanz	Mehrschichtige Gefäße grauer Substanz	Einschichtige Gefäße grauer Substanz	Mehrschichtige Gefäße weißer Substanz
Einschichtige Gefäße grauer Substanz		1,000		
Weißer Substanz	0,625			
Mehrschichtige Gefäße weißer Substanz		1,000	1,000	
Einschichtige Gefäße weißer Substanz		1,000	1,000	1,000

## 6.3.2 Faktor X in Glioblastomen

### 6.3.2.1 Faktor-X-Expression der Tumorzone

Bei der Untersuchung der „Tumorzone“ exklusive Zellen der Pseudopalisaden erwiesen sich 85% der Glioblastome als Faktor-X-positiv. Die Werte der Expressionsdichte lagen durchweg im „niedrigen“ Bereich. Der Mittelwert und die einfache Standardabweichung der Faktor-X-Expressionsdichte betrugen  $16,11 \pm 16,76$  (Tabelle 25).

Die Expression des Antigens war oft lokal begrenzt. Durchschnittlich 4% der Zellen der „Tumorzone“ in Proben mit Faktor-X-Positivität dieses Gewebeanteils wiesen eine deutlich positive Faktor-X-Immunreaktivität auf. Abbildung 36 zeigt die lichtmikroskopische Darstellung der Tumorzone exklusive Zellen der Pseudopalisaden in Faktor-X-Immundetektion sowie in H/E-Färbung zum Vergleich.

Von den untersuchten Glioblastomen enthielten 43 Proben Pseudopalisaden in der Tumor- und Nekrosezone. Für 54% dieser Glioblastome war eine Faktor-X-Positivität der Zellen der Pseudopalisaden charakterisierend. Die Werte der Faktor-X-Expressionsdichte lagen in diesen Fällen im „niedrigen“ Bereich. Die Expression des Antigens trat oft mit lokaler Häufung auf. Der Mittelwert und die einfache Standardabweichung der Faktor-X-Expressionsdichte betrugen  $6,33 \pm 11,61$  (Tabelle 25).

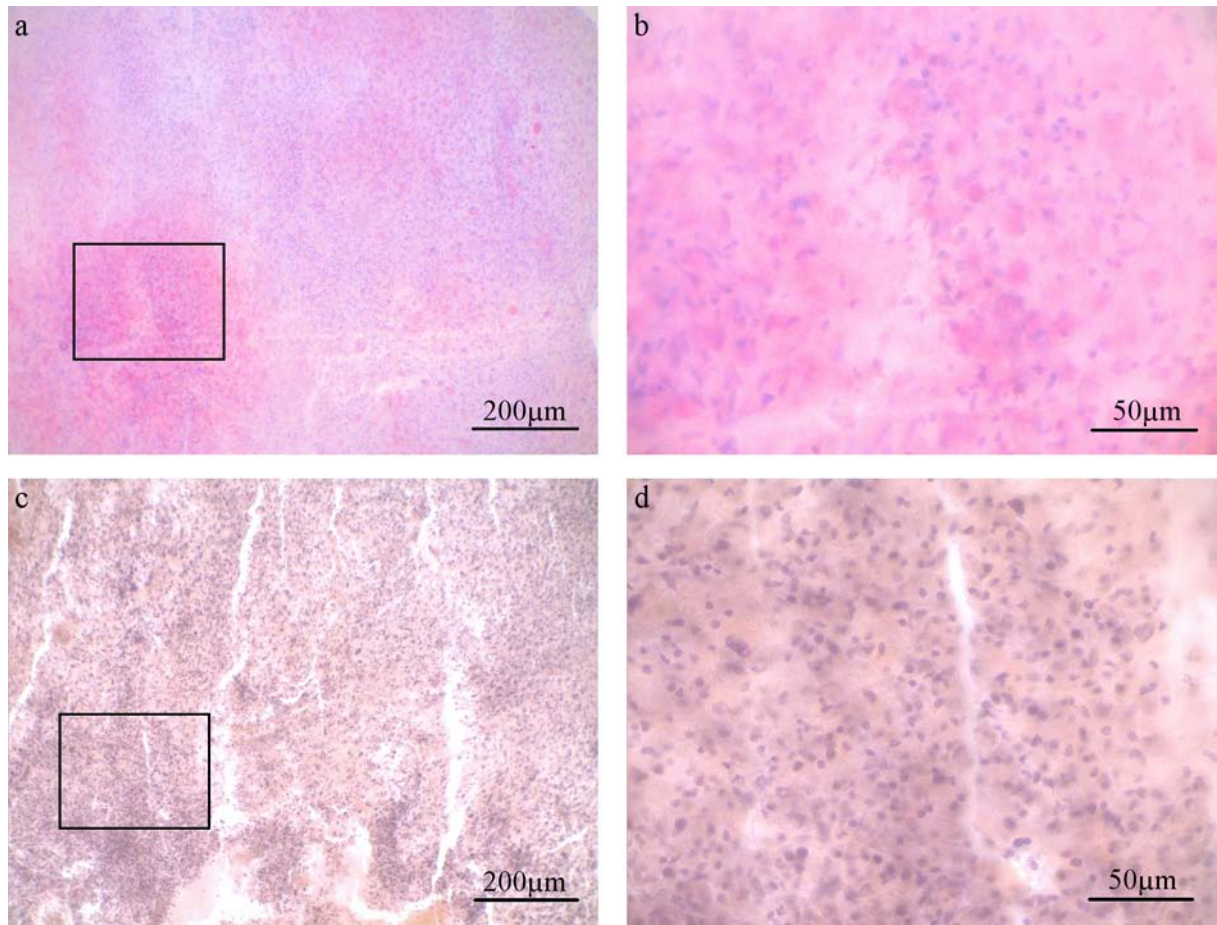
**Tabelle 25: Faktor-X-Expressionsdichte der Glioblastomproben**

Angegeben sind der Mittelwert, die einfache Standardabweichung sowie der jeweils Faktor-X-positive Probenanteil.

Gewebetyp	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	Faktor-X-positiver Probenanteil
„Tumorzone“	16,11 $\pm$ 16,76	85%
Zellen der Pseudopalisaden	6,33 $\pm$ 11,61	54%
Invasionszone	13,27 $\pm$ 15,98	76%

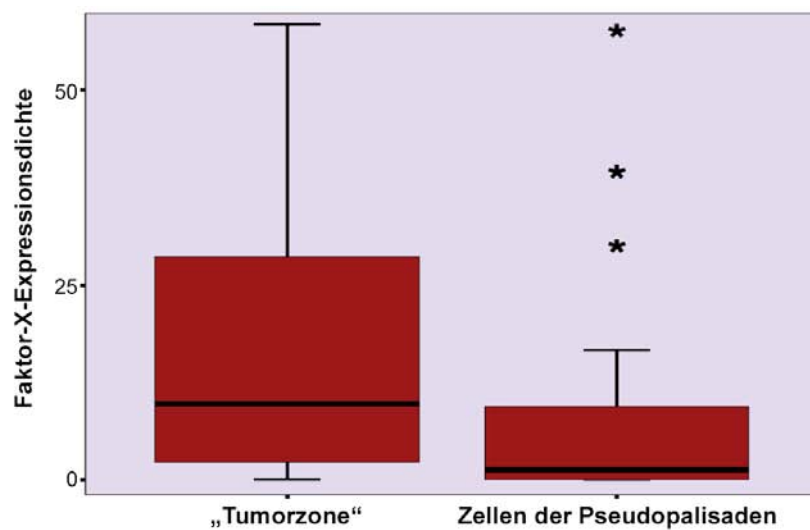
Proben mit Faktor-X-Positivität der Zellen der Pseudopalisaden wiesen meist auch eine positive Faktor-X-Immunreaktivität der „Tumorzone“ exklusive Zellen der Pseudopalisaden auf. Durch

vereinzelte Abweichungen von dieser Beobachtung reduzierte sich die Zahl der Glioblastomproben mit ausschließlicher Faktor-X-Negativität der Tumorzone auf 8%.



**Abbildung 36: Lichtmikroskopische Darstellung der Tumorzone in Faktor-X- und H/E-Färbung**

Abbildung (a) zeigt die Tumorzone in Faktor-X-Immunfärbung. Durch die rötliche Zytoplasmafärbung wird eine mäßige bis stark positive Faktor-X-Expression erkennbar. Der markierte Ausschnitt aus (a) ist in (b) vergrößert dargestellt. Abbildung (c) stellt das entsprechende Gewebe in H/E-Färbung dar. Der markierte Ausschnitt ist in (d) vergrößert abgebildet. Die durch Hämatoxylin gefärbten Zellkerne erscheinen in allen Abbildungen bläulich.

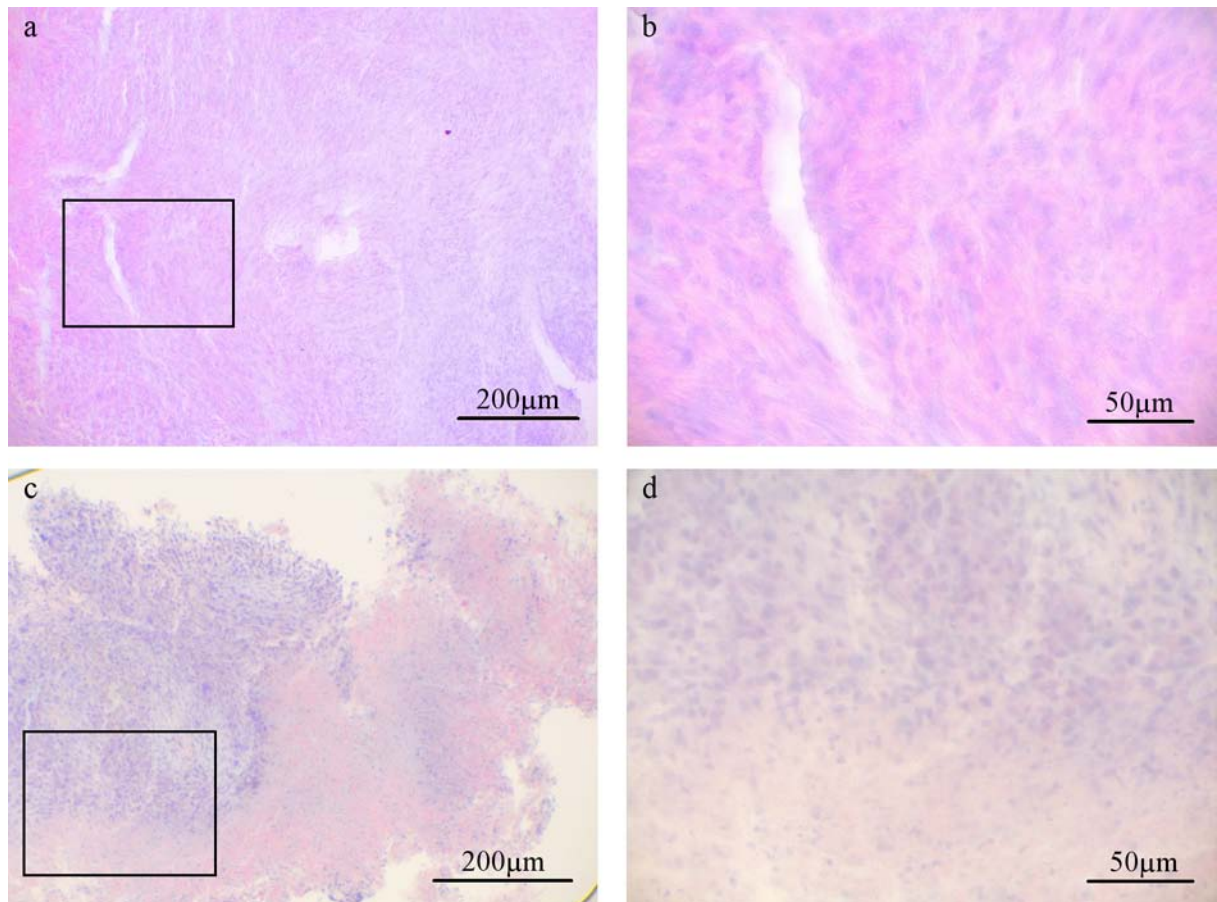


**Abbildung 37: Faktor-X-Expressionsdichte der „Tumorzone“ und der Zellen der Pseudopalisaden**

Der Median zeigt an, dass sowohl die „Tumorzone“ exklusive Zellen der Pseudopalisaden als auch die Zellen der Pseudopalisaden selbst jeweils in mehr als der Hälfte der Fälle Faktor-X-positiv sind. Die Stärke der Expressionsdichte liegt im „niedrigen“ Bereich. Die Sterne markieren Ausreißer.



Einen Eindruck von den beschriebenen Ergebnissen vermittelt das Diagramm in Abbildung 37. Abbildung 38 zeigt eine lichtmikroskopische Darstellung der Tumorzone unter Differenzierung der beiden bewerteten Gewebe.

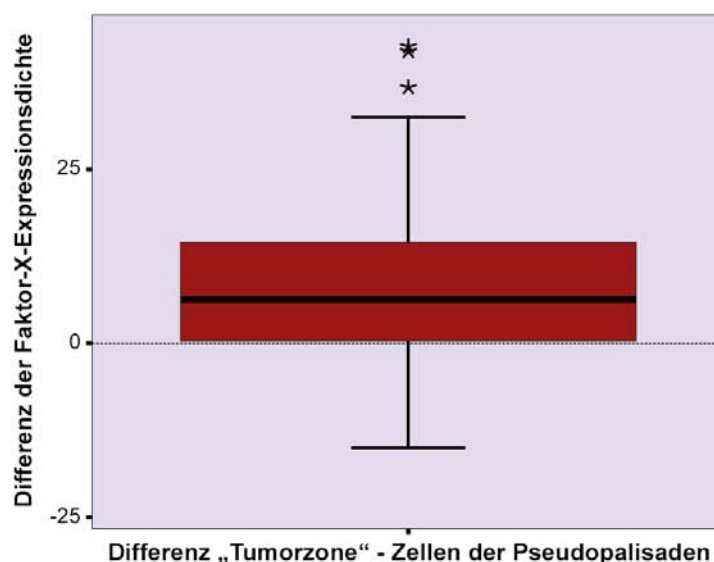


**Abbildung 38: Lichtmikroskopische Darstellung der Faktor-X-Expression in der Tumorzone**  
 Abbildung (a) stellt einen Bereich der Tumorzone dar, in dem sich keine Pseudopalisaden befinden. Die rötliche Zytoplasmafärbung zeigt eine mäßig positive Immunreaktivität an. Der in (a) markierte Ausschnitt ist in (b) vergrößert dargestellt. Abbildung (c) sowie die Vergrößerung des in (c) markierten Ausschnitts in (d) zeigen Zellen der Pseudopalisaden am Rande einer Nekrosezone. Diese sind Faktor-X-negativ. Die Zellkerne sind in allen Abbildungen durch Hämatoxylin bläulich gefärbt.

Nach der Faktor-X-Expressionsanalyse der „Tumorzone“ und der Zellen der Pseudopalisaden wurden die beiden Gewebeanteile miteinander verglichen. Die deskriptive Statistik zeigte, dass der Anteil von Proben mit einer positiven Faktor-X-Immunreaktivität bei der „Tumorzone“ deutlich höher lag als bei den Zellen der Pseudopalisaden.

Die Faktor-X-Expressionsdichte wurde durch den Wilcoxon-Test im direkten Vergleich auf signifikante Unterschiede überprüft. Es konnte festgestellt werden, dass die „Tumorzone“ eine signifikant höhere Faktor-X-Expressionsdichte aufweist als Zellen der Pseudopalisaden. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  war für dieses Ergebnis kleiner als 0,001 (Tabelle 27).

Eine Veranschaulichung des beschriebenen Ergebnisses bietet das Diagramm in Abbildung 39.



**Abbildung 39: Differenz zwischen der Faktor-X-Expressionsdichte der „Tumorzone“ und der Zellen der Pseudopalisaden der jeweils gleichen Tumorprobe**

Der Median liegt deutlich im positiven Bereich ( $>0$ ). Er zeigt an, dass die Faktor-X-Expressionsdichte in mehr als der Hälfte der Fälle in der „Tumorzone“ höher war als in den Zellen der Pseudopalisaden. Der Unterschied erwies sich im Wilcoxon-Test als signifikant. Die Sterne markieren Ausreißer.

Neben den bereits charakterisierten Gewebeanteilen wurden in der Tumorzone auch die Blutgefäße bewertet. Mehrschichtige Gefäße dieser Zone waren in 60% der Glioblastome durch Faktor-X-Positivität charakterisiert. Die Expressionsdichte war bis auf eine Ausnahme „niedrig“. Eine der 52 Proben wies eine „mittlere“ Expressionsdichte dieses Gewebeanteils auf. Der Mittelwert und die einfache Standardabweichung der Faktor-X-Expressionsdichte betrugen  $12,42 \pm 17,04$  (Tabelle 26).

**Tabelle 26: Faktor-X-Expressionsdichte der Blutgefäße in den Glioblastomproben**

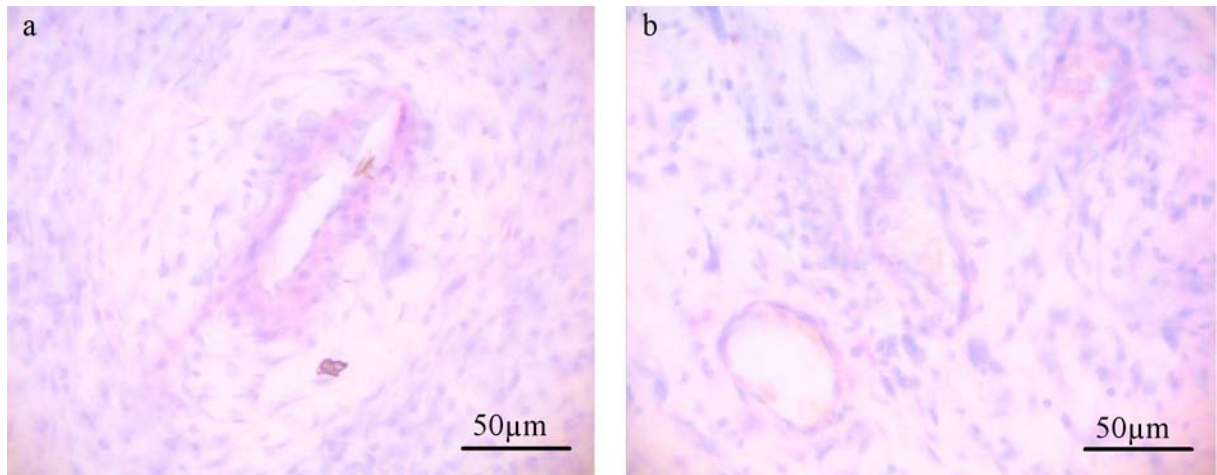
Angegeben sind der Mittelwert, die einfache Standardabweichung sowie der jeweils Faktor-X-positive Probenanteil.

Gewebetyp	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	Faktor-X-positiver Probenanteil
Mehrschichtige Gefäße Tumorzone	12,42 $\pm$ 17,04	60%
Einschichtige Gefäße Tumorzone	20,19 $\pm$ 21,62	69%
Mehrschichtige Gefäße Invasionszone	8,53 $\pm$ 11,74	50%
Einschichtige Gefäße Invasionszone	16,07 $\pm$ 19,68	52%

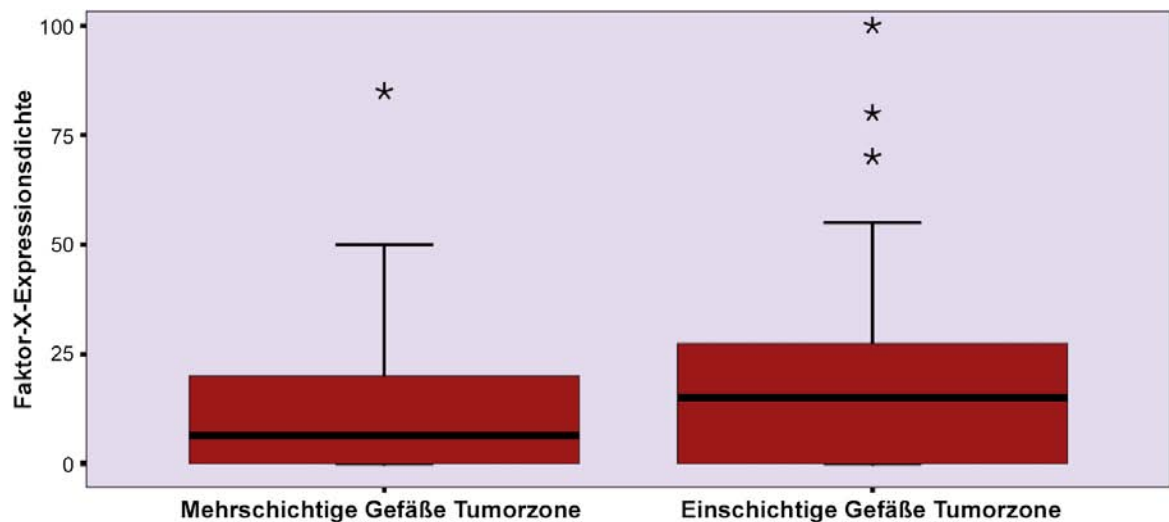
Einschichtige Blutgefäße der Tumorzone wiesen in 69% der Proben Faktor-X-Positivität auf. Für die meisten dieser Proben war eine „niedrige“ Expressionsdichte kennzeichnend. Nur drei Proben wichen hiervon ab und zeigten eine Expressionsdichte im „mittleren“ Bereich. Der Mittelwert und die einfache Standardabweichung der Faktor-X-Expressionsdichte betrugen  $20,19 \pm 21,62$  (Tabelle 26).

Abbildung 40 zeigt Beispiele von Blutgefäßen der Tumorzone in Faktor-X-Immundetektion. Ein Vergleich der Faktor-X-Expression mehrschichtiger und einschichtiger Blutgefäße der Tumorzone zeigte einen etwas höheren Anteil Faktor-X-positiver Proben bei den einschichtigen

Gefäßen als bei den mehrschichtigen. Der direkte Vergleich zwischen beiden Gewebeanteilen hinsichtlich der Faktor-X-Expressionsdichte ergab signifikant höhere Werte der einschichtigen Gefäße als der mehrschichtigen Gefäße. Eine Überprüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mit dem Wilcoxon-Test. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  betrug für dieses Ergebnis 0,001 (Tabelle 28). Das Diagramm in Abbildung 41 veranschaulicht das beschriebene Ergebnis.



**Abbildung 40: Lichtmikroskopische Faktor-X-Immunreaktivität der Blutgefäße der Tumorzone**  
In (a) ist ein mehrschichtiges Gefäß der Tumorzone abgebildet, das eine durch rötliche Zytoplasmafärbung des Endothels angezeigte mäßig positive Faktor-X-Immunreaktivität aufweist. In (b) sind einschichtige Gefäße mit einer schwach positiven Immunreaktivität dargestellt.



**Abbildung 41: Faktor-X-Expressionsdichte der Blutgefäße der Tumorzone**  
Der Median (jeweils  $>0$ ) zeigt an, dass die mehrschichtigen und die einschichtigen Gefäße in der Mehrzahl der Fälle Faktor-X-positiv waren. Die Faktor-X-Expressionsdichte in beiden Gewebeanteilen lag durchschnittlich im „niedrigen“ Bereich. Im Wilcoxon-Test wurden signifikant höhere Werte der einschichtigen als der mehrschichtigen Gefäße beobachtet. Die Sterne markieren Ausreißer.

### 6.3.2.2 Faktor-X-Expression der Invasionszone

42 der Glioblastomproben, die gegen Faktor X gefärbt waren, enthielten eine Invasionszone. Das Gewebe der Invasionszone war in 76% der Proben durch eine positive Immunreaktivität gegen Faktor X gekennzeichnet. Die Expressionsdichte lag dabei in allen Fällen im „niedrigen“

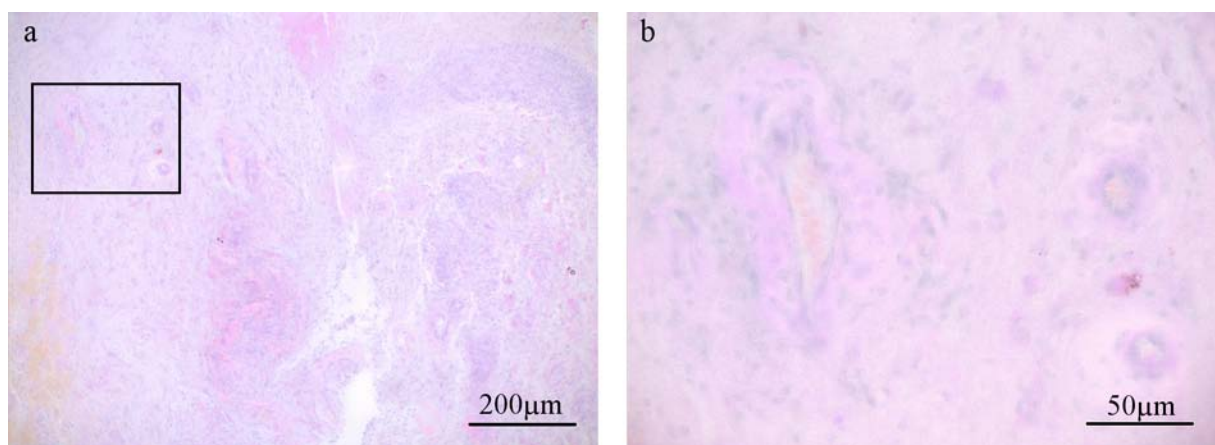


Bereich. Der Mittelwert und die einfache Standardabweichung der Faktor-X-Expressionsdichte in der Invasionszone betrugen  $13,27 \pm 15,98$  (Tabelle 25). Die Faktor-X-Expression trat überwiegend mit lokaler Häufung auf. Etwa 2% der Zellen von Proben mit einer Faktor-X-positiven Invasionszone waren durch eine deutlich positive Faktor-X-Immunreaktivität dieses Gewebeanteils gekennzeichnet.

Neben dem eigentlichen Gewebe der Invasionszone wurden Blutgefäße hinsichtlich ihrer Faktor-X-Expression bewertet. 50% der Proben zeigten eine Faktor-X-Positivität der mehrschichtigen Gefäße. Die Expressionsdichte lag in all diesen Fällen im „niedrigen“ Bereich. Der Mittelwert und die einfache Standardabweichung betrugen  $8,53 \pm 11,74$  (Tabelle 26).

Einschichtige Gefäße wurden in 52% der Proben durch eine positive Immunreaktivität gegen Faktor X charakterisiert. Bis auf einen Fall mit einer „mittleren“ Expressionsdichte lagen die Werte im „niedrigen“ Bereich. Der Mittelwert und die einfache Standardabweichung der Faktor-X-Expressionsdichte betrugen  $16,07 \pm 19,68$ .

Eine lichtmikroskopische Darstellung der Gefäße der Invasionszone zeigt Abbildung 42.

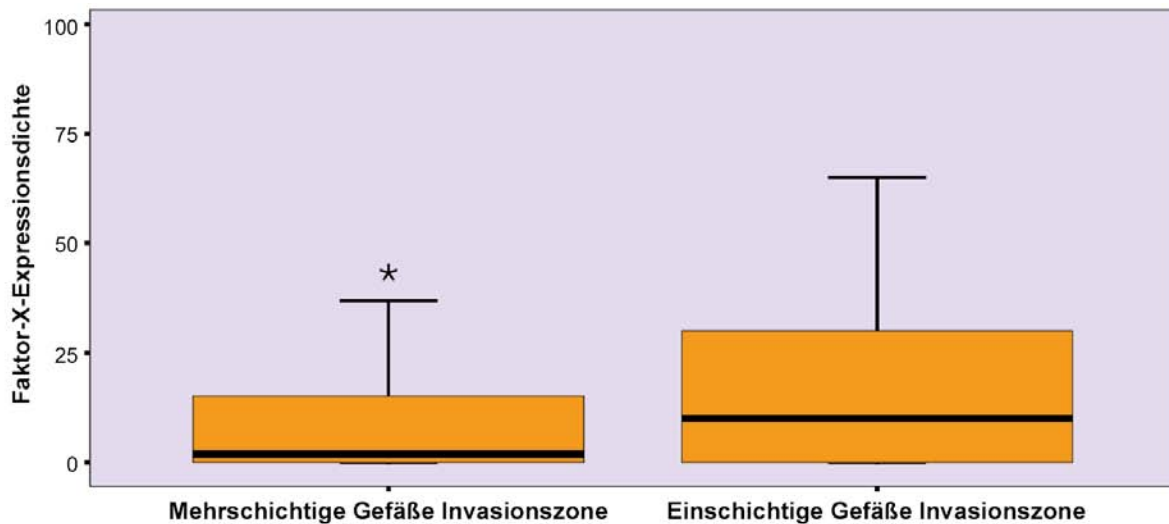


**Abbildung 42: Lichtmikroskopische Faktor-X-Immunreaktivität der Blutgefäße der Invasionszone**

Die Abbildung (a) zeigt anhand der rötlichen Zytoplasmafärbung des Endothels, dass die mehrschichtigen und die einschichtigen Gefäße der Invasionszone eine schwache bis mäßig positive Faktor-X-Immunreaktivität aufweisen. Der in (a) markierte Ausschnitt ist in Abbildung (b) vergrößert dargestellt.

Die Faktor-X-Expression mehrschichtiger und einschichtiger Blutgefäße der Invasionszone wurde anschließend miteinander verglichen. In der deskriptiven Statistik war für beide Gewebeanteile ein ähnlicher Probenanteil mit Faktor-X-Positivität zu beobachten. Die Expressionsdichte wurde mit dem Wilcoxon-Test auf signifikante Unterschiede geprüft. Hierbei stellte sich eine signifikant höhere Faktor-X-Expression der einschichtigen Gefäße der Invasionszone als der mehrschichtigen Gefäße dieser Zone heraus. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p betrug für dieses Ergebnis 0,012 (Tabelle 28).

Das Diagramm in Abbildung 43 veranschaulicht dieses Ergebnis.



**Abbildung 43: Faktor-X-Expressionsdichte der Blutgefäße der Invasionszone**

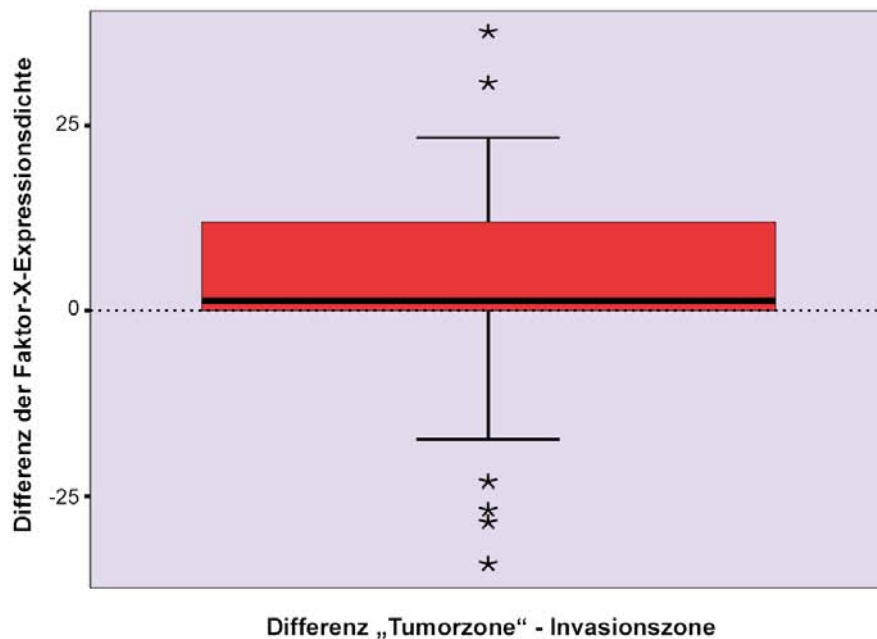
Der Median zeigt an, dass die mehrschichtigen und die einschichtigen Gefäße in der Mehrzahl der Fälle Faktor-X-positiv sind. Die Faktor-X-Expressionsdichte liegt in beiden Gewebeanteilen durchschnittlich im „niedrigen“ Bereich. Der Wilcoxon-Test zeigte, dass die einschichtigen Gefäße signifikant höhere Werte aufweisen als die mehrschichtigen Gefäße. Der Stern markiert einen Ausreißer.

### 6.3.2.3 Vergleich zwischen der Faktor-X-Expression der Tumor- und der Invasionszone

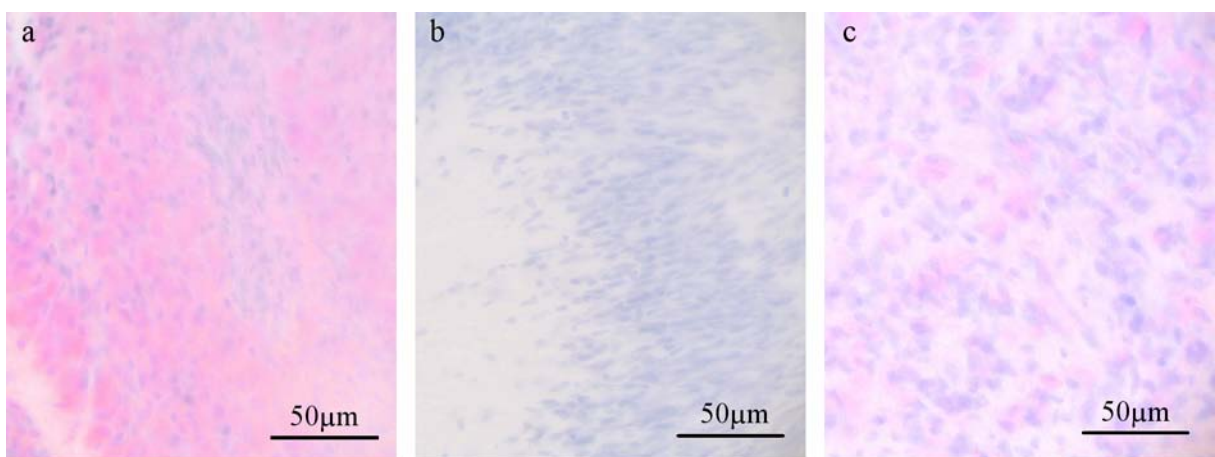
Im Vergleich zwischen Tumorzone und Invasionszone hinsichtlich ihrer Expression von Faktor X erfolgte zunächst eine Gegenüberstellung der differenzierten Gewebeanteile, ohne die Blutgefäße zu berücksichtigen.

Die deskriptive Statistik ergab, dass der Anteil von Proben mit Faktor-X-Negativität der gesamten Tumorzone unter Einschluss der Zellen der Pseudopalisaden deutlich geringer war als der Anteil von Proben mit Faktor-X-Negativität der Invasionszone. Auch die „Tumorzone“ allein ohne Berücksichtigung der Zellen der Pseudopalisaden wurde durch einen höheren Anteil Faktor-X-positiver Proben gekennzeichnet als die Invasionszone. Ein direkter Vergleich der Expressionsdichte der „Tumorzone“ mit der der Invasionszone durch den Wilcoxon-Test zeigte eine signifikant höhere Expression des Faktors X in der „Tumorzone“. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  betrug 0,038 (Tabelle 27). Das Diagramm in Abbildung 44 stellt dieses Ergebnis dar.

Der Vergleich zwischen den Zellen der Pseudopalisaden und der Invasionszone ergab eine signifikant niedrigere Faktor-X-Expressionsdichte der Zellen der Pseudopalisaden als der Invasionszone. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  betrug für dieses Ergebnis 0,023 (Tabelle 27). Die lichtmikroskopische Darstellung in Abbildung 45 veranschaulicht das beschriebene Ergebnis.



**Abbildung 44: Differenzen der Faktor-X-Expressionsdichte zwischen „Tumorzone“ und Invasionszone**  
Der Median liegt im positiven Bereich ( $>0$ ) und zeigt an, dass die „Tumorzone“ in mehr als der Hälfte der Fälle eine höhere Expressionsdichte aufwies als die Invasionszone. Der Unterschied war im Wilcoxon-Test statistisch signifikant.



**Abbildung 45: Lichtmikroskopische Darstellung der Faktor-X-Expression im Tumor**  
Abbildung (a) zeigt die Tumorzone in einem Bereich ohne Pseudopalisaden, (b) Zellen der Pseudopalisaden und (c) die Invasionszone. Die Immunreaktivität der Tumorzone in (a), die durch eine rötliche Zytoplasmafärbung gekennzeichnet ist, weist eine deutlich stärkere Faktor-X-Immunreaktivität auf als die Zellen der Pseudopalisaden und der Invasionszone. Die Zellkerne erscheinen durch Hämatoxylinfärbung bläulich.

**Tabelle 27: Ergebnisse der statistischen Auswertung der Faktor-X-Expressionsdichte der Glioblastomproben.** Signifikante Unterschiede sind in der Tabelle orange unterlegt. Der angegebene Wert ist die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorliegen eines signifikanten Unterschieds.

	„Tumorzone“	Zellen der Pseudopalisaden
Zellen der Pseudopalisaden	$< 0,001$	
Invasionszone	0,038	0,023

In einer zweiten Gegenüberstellung wurden die Blutgefäße der Tumorzone und der Invasionszone hinsichtlich ihrer Faktor-X-Expression miteinander verglichen. Ob signifikante Unterschiede vorlagen, wurde mit dem Wilcoxon-Test geprüft. Es zeigte sich, dass die

mehrschichtigen Gefäße der Tumorzone eine signifikant höhere Faktor-X-Expression aufwiesen als die mehrschichtigen Gefäße der Invasionszone. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p betrug für dieses Ergebnis 0,043 (Tabelle 28). Bei den einschichtigen Gefäßen war die Tendenz erkennbar, dass die einschichtigen Blutgefäße der Tumorzone höhere Faktor-X-Expressionsdichtewerte aufwiesen als die einschichtigen Gefäße der Invasionszone. Dieser Unterschied zeigte sich im Wilcoxon-Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit p von 0,056 jedoch als nicht signifikant.

Gegenüber den mehrschichtigen Blutgefäßen der Invasionszone wiesen die einschichtigen Gefäße der Tumorzone mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit p von weniger als 0,001 signifikant höhere Werte auf.

Zwischen den mehrschichtigen Gefäßen der Tumorzone und den einschichtigen Gefäßen der Invasionszone bestanden keine signifikanten Faktor-X-Expressionsunterschiede. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p betrug für dieses Ergebnis 0,501 (Tabelle 28).

**Tabelle 28: Ergebnisse der statistischen Auswertung der Faktor-X-Expressionsdichte der Blutgefäße in Glioblastomproben.** Signifikante Unterschiede sind in der Tabelle orange unterlegt. Der angegebene Wert ist die Irrtumswahrscheinlichkeit p für das Vorliegen eines signifikanten Unterschieds.

	Mehrschichtige Gefäße Tumorzone	Einschichtige Gefäße Tumorzone	Mehrschichtige Gefäße Invasionszone
Einschichtige Gefäße Tumorzone	0,001		
Mehrschichtige Gefäße Invasionszone	0,043	< 0,001	
Einschichtige Gefäße Invasionszone	0,501	0,056	0,012

### 6.3.3 Faktor-X-Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Referenzproben

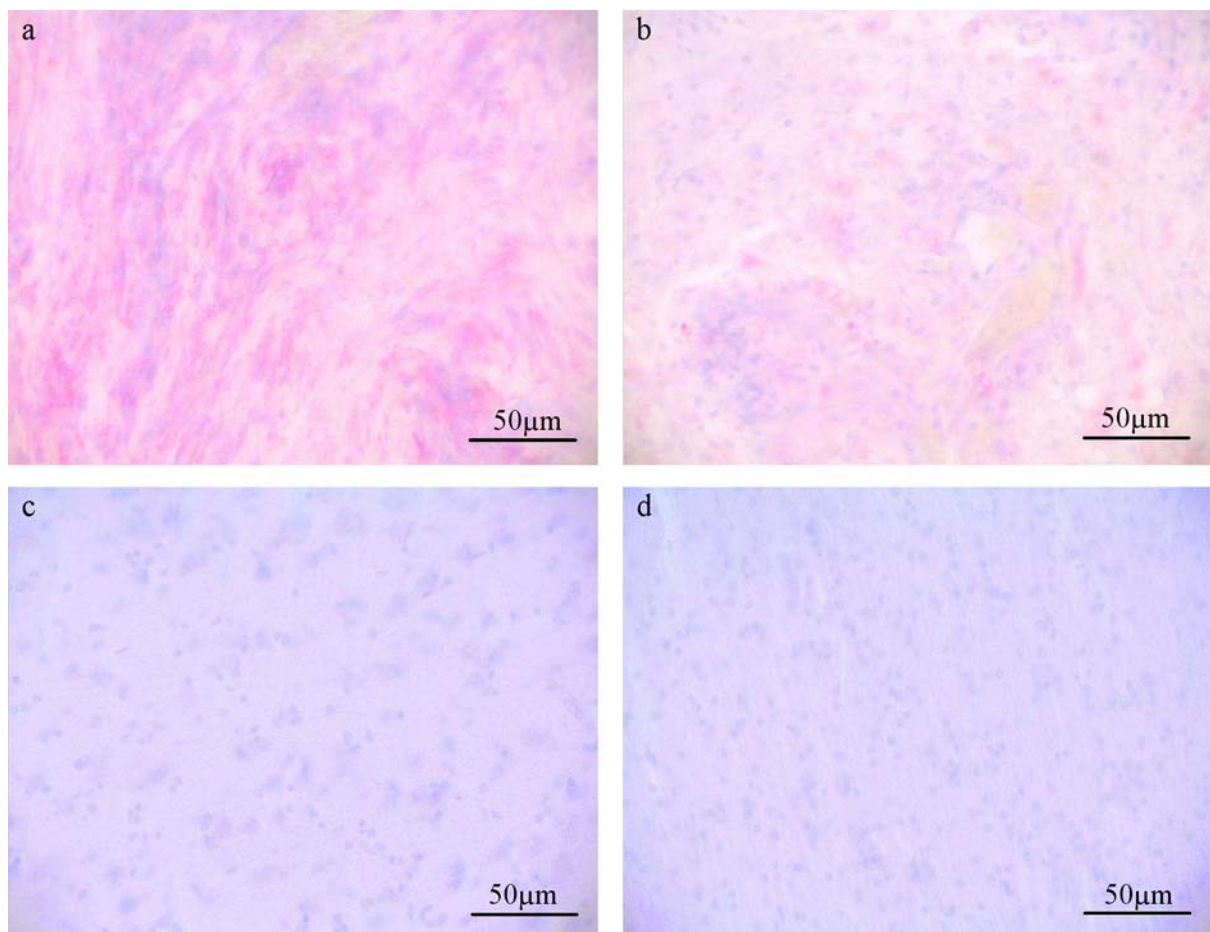
Die Mehrzahl der Referenzproben war Faktor-X-negativ. In der grauen Substanz zeigten 42% der Proben und in der weißen Substanz 26% der Proben eine Faktor-X-Positivität. Demgegenüber waren die in den Glioblastomproben untersuchten Gewebeanteile zu 54 bis 85% Faktor-X-positiv, insofern man die Blutgefäße zunächst nicht mit berücksichtigte.

Die Faktor-X-Expressionsdichte der Glioblastomproben und der Referenzproben wurde mit dem Mann-Whitney-Test auf signifikante Unterschiede geprüft. Es zeigte sich mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit p von weniger als 0,001, dass die „Tumorzone“ eine signifikant höhere Faktor-X-Expression aufwies als die graue und weiße Substanz des Referenzgewebes. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit p von 0,006 war eine signifikant höhere Faktor-X-Expressionsdichte der Invasionszone als der grauen Substanz zu beobachten. Die Invasionszone zeigte ebenfalls signifikant höhere Werte der Faktor-X-Expressionsdichte als die weiße Substanz. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p für dieses Ergebnis war kleiner als 0,001 (Tabelle 29).

Zwischen den Zellen der Pseudopalisaden und der grauen Substanz bestanden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Faktor-X-Expression. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorliegen eines signifikanten Unterschieds betrug 0,488. Gegenüber der weißen Substanz waren tendenziell höhere Werte der Faktor-X-Expressionsdichte der Zellen der Pseudopalisaden zu beobachten. Der Unterschied war bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  von 0,080 nicht signifikant (Tabelle 29). Die lichtmikroskopische Darstellung in Abbildung 46 und das Diagramm in Abbildung 47 veranschaulichen diese Ergebnisse.

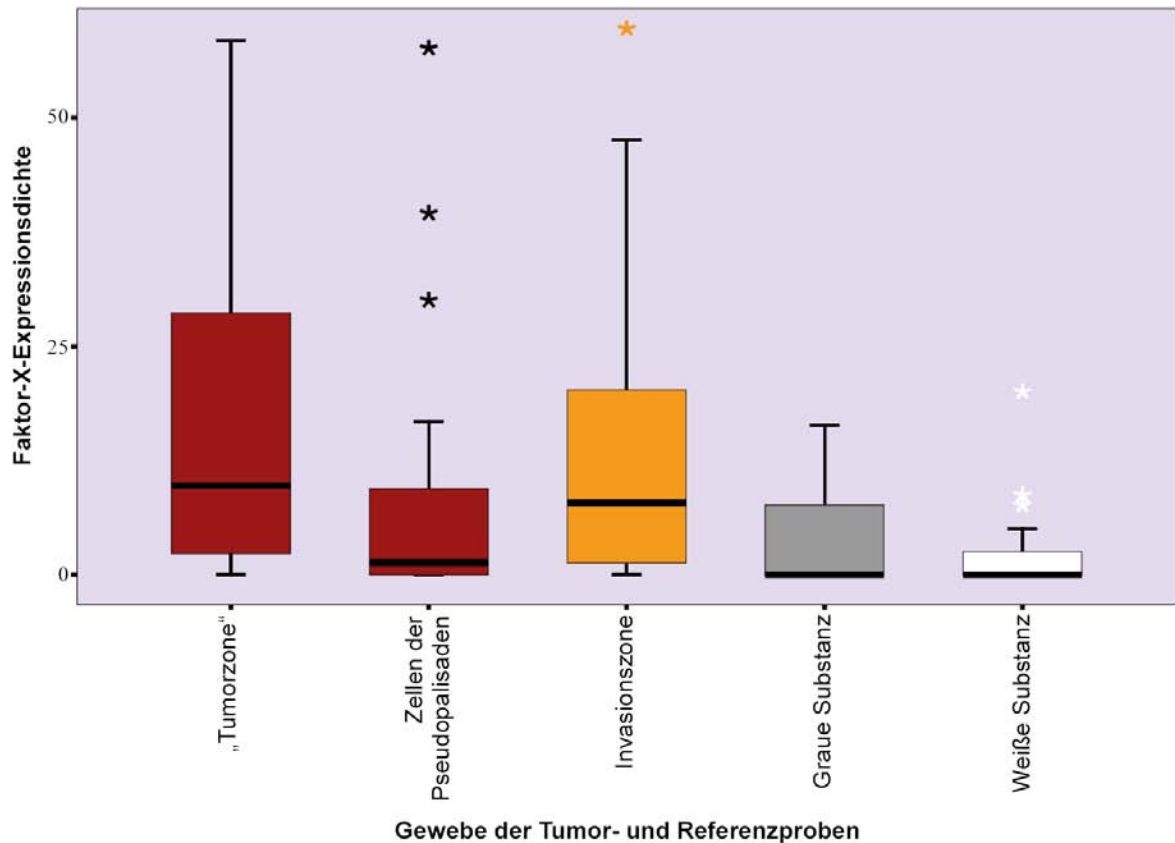
**Tabelle 29: Ergebnisse der statistischen Auswertung der Faktor-X-Expressionsdichte von Glioblastom- und Referenzproben:** Signifikante Unterschiede sind in der Tabelle orange unterlegt. Der angegebene Wert ist die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorliegen eines signifikanten Unterschieds.

	„Tumorzone“	Zellen der Pseudopalisaden	Invasionszone
Graue Substanz	< 0,001	0,488	0,006
Weißer Substanz	< 0,001	0,080	< 0,001



**Abbildung 46: Lichtmikroskopische Darstellung der Faktor-X-Immunreaktivität von Glioblastom- und Referenzproben.** Die Abbildung (a) zeigt die „Tumorzone“, (b) die Invasionszone, (c) die graue Substanz der Referenzproben und (d) die weiße Substanz der Referenzproben. Die Tumor- und die Invasionszone weisen eine deutlich positive Faktor-X-Immunreaktivität auf, die durch eine rötliche Zytoplasmafärbung gekennzeichnet ist. Demgegenüber ist das tumorfreie Referenzgewebe durch Faktor-X-Negativität charakterisiert.





**Abbildung 47: Faktor-X-Expressionsdichte der Gewebe von Glioblastom- und Referenzproben**  
Das Diagramm zeigt, dass die Gewebeanteile der Tumorproben überwiegend durch eine stärkere Faktor-X-Expressionsdichte gekennzeichnet waren als die tumorfreien Referenzproben. Im Mann-Whitney-Test erwiesen sich insbesondere die Unterschiede zwischen der „Tumorzone“ und dem Referenzgewebe bzw. zwischen der Invasionszone und dem Referenzgewebe als statistisch signifikant. Die Sterne markieren Ausreißer.

Anschließend wurde die Faktor-X-Expression der Blutgefäße von Referenz- und Tumorproben miteinander verglichen. Die mehrschichtigen Gefäße der Referenzproben wiesen bis auf jeweils einen Fall in der grauen bzw. der weißen Substanz durchgängig Faktor-X-Negativität auf. Die einschichtigen Blutgefäße der Referenzproben waren in allen Fällen Faktor-X-negativ. Der Probenanteil mit Faktor-X-positiven mehrschichtigen und einschichtigen Gefäße lag mit 50 bis 69% in den Glioblastomproben deutlich höher.

**Tabelle 30: Ergebnisse der statistischen Auswertung der Faktor-X-Expressionsdichte der Gefäße in Glioblastom- und Referenzproben.** Signifikante Unterschiede sind in der Tabelle orange unterlegt. Der angegebene Wert ist die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorliegen eines signifikanten Unterschieds.

	Mehrschichtige Gefäße Tumorzone	Einschichtige Gefäße Tumorzone	Mehrschichtige Gefäße Invasionszone	Einschichtige Gefäße Invasionszone
Mehrschichtige Gefäße graue Substanz	< 0,001	< 0,001	0,001	< 0,001
Einschichtige Gefäße graue Substanz	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Mehrschichtige Gefäße weiße Substanz	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Einschichtige Gefäße weiße Substanz	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Eine Überprüfung mit dem Mann-Whitney-Test bestätigte eine signifikant höhere Faktor-X-Expression der mehrschichtigen Gefäße der Glioblastomproben gegenüber den mehrschichtigen und einschichtigen Gefäßen der Referenzproben. Ebenso war die Faktor-X-Expression einschichtiger Blutgefäße der Tumorproben signifikant höher als die mehrschichtigen und einschichtigen Gefäße des Referenzgewebes. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  war für alle beschriebenen Ergebnisse kleiner als 0,001 (Tabelle 30).

#### **6.3.4 Darstellung der wichtigsten Ergebnisse der Faktor-X-Expressionsanalyse**

Im folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse der Kapitel 6.3.1 bis 6.3.3 zusammengefasst: Die lichtmikroskopische Auswertung des tumorfreien Referenzgewebes zeigte in jeweils mehr als der Hälfte der Proben Faktor-X-Negativität. Signifikante Unterschiede zwischen grauer und weißer Substanz waren nicht zu verzeichnen. Die mehrschichtigen Blutgefäße waren in fast allen Referenzproben Faktor-X-negativ. Für die einschichtigen Gefäße war eine durchgängige Faktor-X-Negativität charakterisierend.

Das Gewebe des Tumors zeigte sowohl in der „Tumorzone“ ohne Berücksichtigung der Zellen der Pseudopalisaden als auch in der Invasionszone eine signifikant stärkere Faktor-X-Expression als die Referenzproben. Zwischen den Zellen der Pseudopalisaden und dem Gewebe der Referenzproben bestanden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Faktor-X-Expression.

Faktor-X-positive Zellen traten in den Glioblastomproben mit deutlicher lokaler Häufung auf. Die Tumorzone ohne Berücksichtigung der Zellen der Pseudopalisaden wies eine signifikant höhere Faktor-X-Expression auf als die Zellen der Pseudopalisaden selbst. Gegenüber der Invasionszone zeigte die Tumorzone ebenfalls eine signifikant höhere Expressionsdichte von Faktor X. Die Zellen der Pseudopalisaden besaßen eine signifikant geringere Faktor-X-Expression als die Invasionszone.

Die Blutgefäße waren in 52 bis 69% der Glioblastomproben Faktor-X-positiv. Die Faktor-X-Expression war in den Gefäßen der Tumorproben signifikant höher als in denen des Referenzgewebes. Einschichtige Blutgefäße der Tumor- bzw. der Invasionszone zeigten überwiegend eine signifikant höhere Faktor-X-Expressionsdichte als die mehrschichtigen Gefäße. Zwischen den einschichtigen Gefäßen der Tumorzone und der Invasionszone bestanden keine signifikanten Unterschiede. Die mehrschichtigen Blutgefäße der Tumorzone wiesen eine signifikant höhere Faktor-X-Expression auf als die mehrschichtigen Gefäße der Invasionszone.



## 6.4 Vergleich zwischen der Expression von NCAM-140, MMP-2 und Faktor X

Nach der Analyse der Referenz- und Glioblastomproben bezüglich der Expression jedes einzelnen Antigens erfolgte eine Untersuchung auf Zusammenhänge zwischen der Expression der verschiedenen Antigene.

Die einzelnen Werte der Expressionsdichte wurden in einer bivariaten Analyse einander gegenübergestellt. Mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten nach Spearman-Rho wurde überprüft, ob ein monotoner Zusammenhang zwischen der Höhe der Werte einzelner Variablen besteht. Bei einem Wert des Koeffizienten zwischen 0,3 und 0,7 wurde der Zusammenhang als mäßig, unterhalb dieses Bereiches als schwach bzw. darüber als stark eingestuft. Es wurde auch jeweils überprüft, ob der Zusammenhang statistisch signifikant ist.

### 6.4.1 Expression der verschiedenen Antigene in den Referenzproben

Zunächst erfolgte ein Vergleich der Referenzproben. NCAM-140 zeigte in der grauen Substanz überwiegend eine „hohe“ bzw. „sehr hohe“ Expressionsdichte. Dagegen war die Expression von MMP-2 in der grauen Substanz aller Referenzproben negativ. Ein Zusammenhang der Expression von MMP-2 mit der Höhe eines der beiden anderen Antigene war daher nicht zu verzeichnen.

Die Faktor-X-Expression in der grauen Substanz war in 42% der Referenzproben positiv mit durchgängig „niedrigen“ Werten. Ein Zusammenhang mit der NCAM-140-Expression der grauen Substanz war nicht zu verzeichnen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorliegen eines statistisch signifikanten Zusammenhangs betrug 0,814 (Tabelle 31).

Die weiße Substanz zeigte eine „niedrige“ Expressionsdichte für NCAM-140. Demgegenüber war die MMP-2-Expression aller Referenzproben in der weißen Substanz negativ. Zusammenhänge zwischen der MMP-2-Expression und der Expression von NCAM-140 waren in der weißen Substanz nicht erkennbar. Auch zwischen der Faktor-X-Expression, die in 26% der Proben in der weißen Substanz positiv war, und der NCAM-140-Expression der weißen Substanz war kein monotoner Zusammenhang erkennbar. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  betrug für dieses Ergebnis 0,803 (Tabelle 31).

**Tabelle 31: Ergebnisse der Korrelationsanalyse zwischen der Expression der untersuchten Antigene im Referenzgewebe.** Es wurden keine signifikanten Zusammenhänge beobachtet. In der Tabelle sind der Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho und die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorliegen eines signifikanten Zusammenhangs angegeben.

	NCAM graue Substanz		NCAM weiße Substanz	
	Spearman-Rho	$p$	Spearman-Rho	$p$
Faktor X graue Substanz	0,058	0,814		
Faktor X weiße Substanz			-0,061	0,803

Die MMP-2-Expression und die Faktor-X-Expression der mehrschichtigen Blutgefäße des Referenzgewebes war in beiden Fällen durch eine geringe Antigenpositivität gekennzeichnet und ergab keinen signifikanten Zusammenhang. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorliegen eines signifikanten Zusammenhangs lag für diese Ergebnisse zwischen 0,432 und 0,679 (Tabelle 32). Einschichtige Blutgefäße des Referenzgewebes waren Faktor-X-negativ. Es bestand daher kein Zusammenhang zwischen der Expression von Faktor X und MMP-2 in diesem Gewebeanteil.

**Tabelle 32: Ergebnisse der Korrelationsanalyse zwischen der Expression der untersuchten Antigene in den Blutgefäßen des Referenzgewebes.** Es wurden keine signifikanten Zusammenhänge beobachtet. In der Tabelle sind der Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho und die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorliegen eines signifikanten Zusammenhangs angegeben.

	MMP-2 mehrschichtige Gefäße graue Substanz		MMP-2 einschichtige Gefäße graue Substanz		MMP-2 mehrschichtige Gefäße weiße Substanz		MMP-2 einschichtige Gefäße weiße Substanz	
	Spearman- Rho	$p$	Spearman- Rho	$p$	Spearman- Rho	$p$	Spearman- Rho	$p$
Faktor X mehrschichtige Gefäße graue Substanz	-0,192	0,432	-0,156	0,522				
Faktor X mehrschichtige Gefäße weiße Substanz					-0,102	0,679	-0,102	0,679

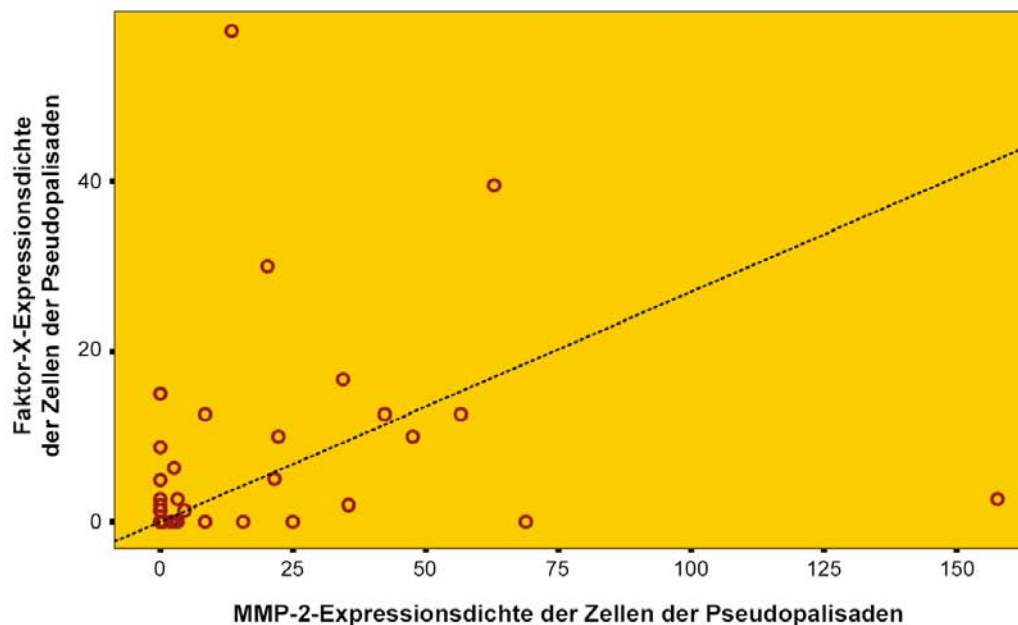
#### 6.4.2 Expression der verschiedenen Antigene in den Glioblastomproben

Die Tumorzone zeigte in der Mehrzahl der Fälle keine oder eine nur sehr geringe NCAM-140-Positivität. Daher waren auch hier keine Zusammenhänge zwischen der Höhe der Expressionsdichte von NCAM-140 und den anderen Antigenen zu beobachten.

Die MMP-2- und Faktor-X-Expression war in der Tumorzone häufig positiv. Die Expressionsdichte von MMP-2 in der „Tumorzone“ ohne Berücksichtigung der Zellen der Pseudopalisaden zeigte keinen signifikanten Zusammenhang zu der Expressionsdichte von Faktor X in diesem Gewebeanteil. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorliegen eines signifikanten Zusammenhangs betrug 0,116 (Tabelle 33). In der Korrelationsanalyse war ein mäßig positiver monotoner Zusammenhang zwischen der MMP-2-Expression und der Faktor-X-Expression in den Zellen der Pseudopalisaden zu verzeichnen. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho betrug 0,392. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für dieses Ergebnis hatte den Wert 0,009 (Tabelle 33). Eine höhere Expressionsdichte von MMP-2 war in diesem Gewebeanteil dementsprechend assoziiert mit einer höheren Expressionsdichte von Faktor X. Das Diagramm in Abbildung 48 zeigt die Streuung der Wertepaare der Faktor-X- und der MMP-2-Expressionsdichte in den Zellen der Pseudopalisaden.

**Tabelle 33: Ergebnisse der Korrelationsanalyse zwischen der Expression der untersuchten Antigene im Glioblastomgewebe.** Signifikante Zusammenhänge sind in der Tabelle orange unterlegt. Angegeben sind der Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho und die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorliegen eines signifikanten Zusammenhangs.

	MMP-2 „Tumorzone“		MMP-2 Zellen der Pseudopalisaden		MMP-2 Invasionszone		Faktor X Invasionszone	
	Spearman-Rho	$p$	Spearman-Rho	$p$	Spearman-Rho	$p$	Spearman-Rho	$p$
Faktor X „Tumorzone“	0,220	0,116						
Faktor X Zellen der Pseudopalisaden			0,392	0,009				
Faktor X Invasionszone					0,146	0,358		
NCAM Invasionszone					-0,293	0,056	0,144	0,365

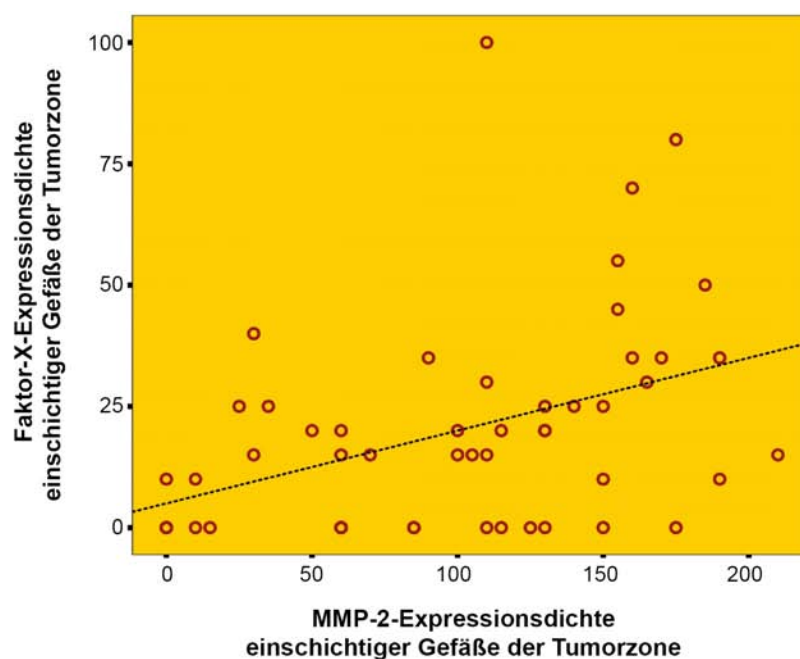


**Abbildung 48: Wertepaare der Faktor-X- und der MMP-2-Expressionsdichte der Zellen der Pseudopalisaden**  
Das Streudiagramm zeigt, dass eine stärkere Expression von MMP-2 in den Zellen der Pseudopalisaden in einigen Proben mit einer stärkeren Faktor-X-Expression dieses Gewebeanteils assoziiert war. In der Korrelationsanalyse mit dem Korrelationskoeffizienten nach Spearman-Rho zeigte sich, dass ein mäßig positiver monotoner Zusammenhang zwischen der Expression der beiden Antigene in den Zellen der Pseudopalisaden bestand. Der Zusammenhang war statistisch signifikant. Er kann auch nichtlinear sein. Der dargestellte Graph ist eine Bezugslinie und dient lediglich zur groben Orientierung.

In der Invasionszone lag die NCAM-140-Expressionsdichte überwiegend bei „mittleren“ Werten. Zwischen der NCAM-140-Expression und der MMP-2-Expression dieses Gewebeanteils war die Tendenz zu einem negativen monotonen Zusammenhang zu verzeichnen. Es war also der Trend erkennbar, dass eine stärkere NCAM-140-Expression der Invasionszone mit einer schwächeren MMP-2-Expression korreliert. Dieser Zusammenhang war mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  von 0,056 jedoch nicht signifikant. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von NCAM-140 und von Faktor X in der Invasionszone war mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  von 0,365 nicht zu verzeichnen. Die

Positivität der Invasionszone für MMP-2 und Faktor X war insgesamt geringer als in der Tumorzone. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden Antigenen war mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  von 0,358 nicht zu beobachten (Tabelle 33).

Die Blutgefäße des Tumors wiesen in vielen Fällen eine Positivität für MMP-2 bzw. für Faktor X auf. Ein Vergleich ergab einen mäßig positiven monotonen Zusammenhang zwischen der MMP-2-Expression und der Faktor-X-Expression einschichtiger Blutgefäße der Tumorzone. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho betrug 0,434. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  hatte den Wert 0,001 (Tabelle 34). Eine stärkere Expression von MMP-2 in den einschichtigen Gefäßen der Tumorzone korrelierte demnach mit einer stärkeren Faktor-X-Expression in diesem Gewebeanteil. Das Diagramm in Abbildung 49 zeigt die Streuung der Wertepaare der Faktor-X- und der MMP-2-Expressionsdichte in den einschichtigen Blutgefäßen der Tumorzone.



**Abbildung 49: Wertepaare der Faktor-X- und der MMP-2-Expressionsdichte in den einschichtigen Blutgefäßen der Tumorzone.** Das Streudiagramm zeigt, dass eine stärkere Expression von MMP-2 in den einschichtigen Blutgefäßen der Tumorzone in einigen Proben mit einer stärkeren Faktor-X-Expression dieses Gewebeanteils assoziiert war. Die Überprüfung mit dem Korrelationskoeffizienten nach Spearman-Rho ergab, dass ein mäßig positiver monotoner Zusammenhang zwischen der Expression der beiden Antigene in den einschichtigen Gefäßen der Tumorzone bestand. Der Zusammenhang war statistisch signifikant. Er kann auch nichtlinear sein. Der dargestellte Graph ist eine Bezugslinie und dient lediglich zur groben Orientierung.

Zwischen der Expression beider Antigene in den anderen differenzierten Gruppen von Blutgefäßen bestand kein signifikanter Zusammenhang. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorhandensein eines statistisch signifikanten Zusammenhangs lag für diese Ergebnisse zwischen 0,073 und 0,882 (Tabelle 34).

**Tabelle 34: Ergebnisse der Korrelationsanalyse zwischen der Expression der untersuchten Antigene in den Blutgefäßen des Glioblastomgewebes.** Signifikante Zusammenhänge sind in der Tabelle orange unterlegt. Angegeben sind der Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho und die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für das Vorliegen eines signifikanten Zusammenhangs.

	MMP-2 mehrschichtige Gefäße Tumorzone		MMP-2 einschichtige Gefäße Tumorzone		MMP-2 mehrschichtige Gefäße Invasionszone		MMP-2 einschichtige Gefäße Invasionszone	
	Spearman -Rho	$p$	Spearman -Rho	$p$	Spearman -Rho	$p$	Spearman -Rho	$p$
Faktor X mehrschichtige Gefäße Tumorzone	-0,049	0,732	0,251	0,073				
Faktor X einschichtige Gefäße Tumorzone	0,137	0,333	0,434	0,001				
Faktor X mehrschichtige Gefäße Invasionszone					-0,133	0,402	-0,024	0,882
Faktor X einschichtige Gefäße Invasionszone					-0,051	0,750	0,147	0,353

#### 6.4.3 Darstellung der wichtigsten Ergebnisse des Vergleiches zwischen den Antigenen

Im folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse der Kapitel 6.4.1 und 6.4.2 zusammengefasst. Die bivariate Analyse mit dem Korrelationskoeffizienten nach Spearman-Rho ergab keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der NCAM-140-Expression, der MMP-2-Expression und der Faktor-X-Expression der Referenzproben. In den Glioblastomen zeigte sich ein mäßig positiver monotoner Zusammenhang zwischen der MMP-2-Expression und der Faktor-X-Expression der Zellen der Pseudopalisaden. Der Zusammenhang war signifikant und zeigt an, dass eine stärkere MMP-2-Expression in diesem Bereich mit einer stärkeren Faktor-X-Expression assoziiert war. In entsprechender Weise war ein signifikanter, mäßig positiver monotoner Zusammenhang zwischen der Expression von MMP-2 und von Faktor-X in den einschichtigen Blutgefäßen der Tumorzone zu verzeichnen. Zwischen der NCAM-140-Expression und der MMP-2-Expression der Invasionszone war ein negativer monotoner Zusammenhang im Trend erkennbar. Dieser war statistisch nicht signifikant. Er zeigt, dass eine stärkere NCAM-140-Expression der Invasionszone tendenziell mit einer schwächeren MMP-2-Expression assoziiert war.

Weitere signifikante Zusammenhänge zwischen der Expression der drei untersuchten Antigene waren in den Glioblastomproben nicht zu verzeichnen.

## **7 Diskussion**

### **7.1 Einführung**

Glioblastome sind durch verschiedene Charakteristika eines aggressiven Tumorwachstums wie zentrale Nekrosen und eine periphere Tumorzellinvasion in das umliegende Gewebe gekennzeichnet (Kleihues und Cavenee 2000). Eine Tumorgrenze ist durch die starke Zellinvasion so gut wie nie erkennbar. Die unterschiedlichen tumorbiologischen Eigenschaften von Tumorzone und Invasionszone lassen aber vermuten, dass die molekulare Ausstattung in den beiden Arealen verschieden ist und zur Abgrenzung des Tumors zum peritumoralen Hirngewebe beitragen kann.

Bezüglich ihrer Bedeutung bei der Tumorprogression wird ein umfassendes Spektrum unterschiedlicher Proteine diskutiert. Zentrale Themen im Prozess der Tumorentwicklung und -ausbreitung wie die Invasion lenken dabei den Blick unter anderem auf Zelladhäsionsmoleküle (Edvardsen et al. 1994). Ein Beispiel hierfür stellt das Neurale Zelladhäsionsmolekül (NCAM), ein Immunglobulin-ähnliches Molekül des Nervensystems, dar (Rønn et al. 1998). Es beeinflusst in physiologischer Weise die Migration, Differenzierung und Proliferation von Neuronen und Gliazellen (Walmod et al. 2004). Weiterhin sind bei der Invasion Proteasen von großer Bedeutung (Chintala et al. 1999). Zu ihnen gehört die Matrixmetalloproteinase-2. Sie dient dem Abbau bzw. der Spaltung extrazellulärer Matrix (McCawley und Matrisian 2000).

Charakteristisch für Glioblastome sind neben der diffusen Invasion, wie bereits erwähnt, Nekrosen und Einblutungen (Schlegel et al. 2003). Sie lassen unter anderem die Frage nach einer möglichen tumorbiologischen Funktion von Gerinnungsfaktoren aufkommen. Der Gerinnungsfaktor X als ein Vertreter nimmt eine Schlüsselstellung innerhalb der Gerinnungskaskade ein (Löffler und Petrides 2003). Darüber hinaus kann er über proteaseaktivierte Rezeptoren (PARs) auf vielfältige biologische Prozesse modulierend wirken und hat sich als Wachstumsfaktor erwiesen (Ossovska und Bunnett 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden 52 Proben humaner Glioblastome sowie 20 Proben tumorfreien Referenzgewebes der grauen und weißen Hirnsubstanz immunhistochemisch auf die Expression von NCAM, MMP-2 und Faktor X hin untersucht. Die Auswertung erfolgte teilweise makroskopisch und immer lichtmikroskopisch. Die Tumorzone und die Invasionszone der Glioblastomproben wurden jeweils getrennt analysiert. Da der Färbeprozess standardisiert war, entsprach die Intensität der Immunfärbung dem Grad der jeweiligen Antigenexpression. Sie wurde im Zusammenhang mit dem Anteil antigenpositiver Zellen subjektiv bewertet. Die Daten wurden statistisch erfasst und anschließend einer Prüfung auf signifikante Unterschiede der jeweiligen Antigenexpression zwischen den verschiedenen Gewebetypen zugeführt.



## **7.2 Bewertung der verwendeten Methoden**

### **7.2.1 Verwendung von Autopsiegewebe als tumorfreie Referenzproben**

Bei sehr wenigen Indikationen wie der Epilepsiechirurgie wird Patienten in relevanten Mengen tumorfreies Hirngewebe operativ entnommen. Jede andere Gewinnung tumorfreien Hirngewebes als Operationsmaterial ist ethisch nicht vertretbar, so dass in der Forschung überwiegend auf Autopsiegewebe des Hirns zurückgegriffen werden muss.

In dieser Arbeit wurden 20 Referenzproben untersucht, bei denen es sich durchgängig um Autopsiegewebe des Pathologischen Instituts in Jena handelte. Um die Zell- und Gewebestrukturen durch Proteinvernetzung in einem weitgehend natürlichen Zustand zu erhalten, wurden die Referenzproben genau wie die Tumorproben aus Operationsmaterial mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (Bucher und Wartenberg 1991). Auf diese Weise konnte die postmortal einsetzende Autolyse unterbrochen werden, die durch noch aktive zelleigene Enzyme zum Abbau von Proteinen führt (Lüllmann-Rauch 2006). Bei dem Autopsiegewebe ist jedoch davon auszugehen, dass bis zum Zeitpunkt der Fixierung bereits ein Verlust von Proteinen eintrat.

Das Protein NCAM-140 konnte trotz dieses Umstandes bei der Auswertung in der grauen Substanz aller Referenzproben in signifikant höherem Maße nachgewiesen werden als in der Tumorzone und der Invasionszone der Tumorproben. Insofern eine Autolyse dieses Proteins auftrat, war sie zumindest in der grauen Substanz nicht von experimenteller Relevanz.

MMP-2 und Faktor X wurden jeweils nur in sehr geringem Maße in den Referenzproben beobachtet, während sie in den Tumorproben deutlich nachweisbar waren. Ein relevanter Proteinverlust aufgrund von Autolyse ist demnach in den Referenzproben nicht sicher auszuschließen. Allerdings zeigte sich bereits in der Invasionszone der Glioblastomproben eine zum Teil signifikant geringere Expression beider Antigene als in der Tumorzone. Zudem gibt es in der Literatur für MMP-2 Belege, dass sie auch in tumorfreien Referenzproben aus Operationsmaterial nur in äußerst geringem Maße nachgewiesen werden kann (Vince et al. 1999, Raithatha et al. 2000).

Es ist daher davon auszugehen, dass Autopsiegewebe im Rahmen der Untersuchungen dieser Arbeit mit relevanter Aussagekraft als tumorfreies Referenzgewebe verwendet werden kann.

### **7.2.2 Bewertung der makroskopischen Analyse**

Bei der Expressionsanalyse von NCAM-140 in den Tumorproben wurde zunächst eine makroskopische Auswertung mit dem bloßen Auge vorgenommen. Diese Methode wurde bereits in zwei Untersuchungen der neurochirurgischen Klinik Jena verwandt und ihre

Aussagekraft gezeigt (Koblitz 2005, Dünisch 2008). Durch die wiederholte Nutzung der Methode kann ihre Relevanz für eine eventuelle intraoperative Verwendung in der Neurochirurgie überprüft werden. Zudem erhält man so oft schnell und einfach einen groben Überblick hinsichtlich der Position und Ausdehnung der Tumor- und Invasionszone. Allerdings ist durch die eingeschränkte Vergrößerungsmöglichkeit durch das menschliche Auge keine Differenzierung der Antigenexpression auf zellulärer Ebene möglich. Da die beiden anderen untersuchten Proteine MMP-2 und Faktor X weniger flächendeckend sondern vielmehr lokal gehäuft auftraten, wurde bei ihnen daher keine makroskopische Bewertung vorgenommen.

### **7.2.3 Bewertung der lichtmikroskopischen Analyse**

Ein in der biomedizinischen Forschung übliches Verfahren der Antigenexpressionsanalyse nach immunhistochemischer Darstellung ist die lichtmikroskopische Beurteilung der Immunreaktivität (Tews und Nissen 1998-99, Yano et al 2001, Komatsu et al. 2004). Objektivität erlangt diese primär subjektive Untersuchung dadurch, dass verschiedene Untersucher bei der Beurteilung der gleichen Gewebeproben unabhängig voneinander vergleichbare Ergebnisse erhalten.

Zur lichtmikroskopischen Bewertung der Antigenexpression stehen für eine semiquantitative Analyse zwei grundlegende Auswertungskriterien zur Verfügung. In der Arbeit von Tews und Nissen wurde die Expression von NCAM untersucht. Die lichtmikroskopische Auswertung erfolgte anhand des prozentualen Anteils von Zellen, die eine positive Immunreaktivität aufwiesen. Die Skala beinhaltete fünf Stufen. Eine negative Immunreaktivität wurde unterschieden von einer schwach positiven (1-25% positive Zellen), einer mäßig positiven (26-50% positive Zellen), einer stark positiven (51-75% positive Zellen) und einer sehr stark positiven Immunreaktivität (76-100% positive Zellen) (Tews und Nissen 1998-99). Mit einer anderen prozentualen Einteilung wurde dieses Auswertungskriterium auch in verschiedenen Arbeiten verwendet, die sich mit der Expression von MMP-2 befassten (Jäälinojä et al. 2000, Yano et al 2001).

Daneben ist es bei einer standardisierten Färbung möglich, die Antigenexpression anhand der Färbeintensität von Zellen mit positiver Immunreaktivität einzuschätzen. Dieser Methode bedienten sich Sawaya et al. bei einer Expressionsanalyse von MMP-2. Die Intensität der Immunreaktivität wurde auf einer vierstufigen Skala als negativ, schwach positiv, mäßig positiv oder stark positiv bewertet. Vor der eigentlichen Analyse erfolgte die Einstufung einzelner Gewebeproben anhand der Skala, damit sie von den Untersuchern zum Vergleich genutzt werden konnten (Sawaya et al. 1996).

Einzelne Arbeiten bedienen sich bei der Beurteilung der Antigenexpression beider genannter Kriterien. Sowohl der Anteil von Zellen mit positiver Immunreaktivität als auch deren Färbeintensität finden in diesen Analysen Berücksichtigung (Kunishio et al. 2003, Komatsu et al. 2004). Bei der Expressionsanalyse von MMP-2 bei Kunishio et al. wurden beide Aspekte anhand einer vierstufigen Skala getrennt voneinander mit jeweils Null bis drei Punkten bewertet. Anschließend wurden beide Werte addiert und der entstehende Wert für die weitere statistische Auswertung verwendet (Kunishio et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde das bei Kunishio et al. verwendete Verfahren mit modifizierten Skalen genutzt. Der Prozentsatz von Zellen mit positiver Immunreaktivität und die Färbeintensität der Immunreaktivität wurden jedoch jeweils paarweise erfasst und miteinander multipliziert. Der erhaltene Wert für die Expressionsdichte verhindert durch die verwendete Multiplikation beider Einzelwerte eine Überbetonung der Intensität der Immunreaktivität.

#### **7.2.4 Bewertung der Differenzierung zwischen Tumor- und Invasionszone**

In den Glioblastomproben, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, wurden jeweils Tumorzone und Invasionszone voneinander unterschieden. Der Anteil von Tumorzellen ist in der Invasionszone deutlich geringer als in der Tumorzone. Bei der Expressionsanalyse verschiedener Antigene könnten signifikante Unterschiede zwischen den beiden Arealen daher rein theoretisch allein durch den hohen Anteil nicht neoplastisch veränderter Zellen in der Invasionszone verursacht werden. Voraussetzung hierfür wäre ein gleichsinniger, aber stärkerer Expressionsunterschied des Antigens zwischen Tumorproben und tumorfreien Referenzproben. Das Zutreffen dieser Konstellation wäre jedoch ein Beleg dafür, dass eine relevante Abgrenzung des Tumors vom umgebenden peritumoralen Hirngewebe anhand der untersuchten Antigene möglich ist.

### **7.3 Ergebnisse der Expressionsanalyse von NCAM-140**

#### **7.3.1 Aussagekraft der makroskopischen NCAM-140-Expressionsanalyse**

Bei der makroskopischen Auswertung ließ sich wie erwartet nachweisen, dass die graue Substanz des Referenzgewebes die höchste NCAM-140-Expression aller untersuchten Gewebetypen aufwies. Sowohl die Expressionsunterschiede gegenüber der weißen Substanz der Referenzproben als auch gegenüber der Tumorzone und der Invasionszone der Glioblastomproben waren jeweils signifikant. Dagegen war die Expression von NCAM-140 in der weißen Substanz signifikant geringer als in allen anderen untersuchten Gewebetypen. Der

wahrscheinlichste Grund für die deutlich geringere NCAM-140-Expression in der weißen als in der grauen Substanz des Referenzgewebes liegt im anatomischen Aufbau gesunden Hirngewebes. Während die graue Substanz hauptsächlich durch Nervenzellkörper gebildet wird, besteht die weiße Substanz überwiegend aus deren Axonen sowie aus Gliazellen (Trepel 2008). Die Arbeitsgruppe um Rønn beschrieb, dass NCAM in höherem Maße durch Neurone exprimiert wird als durch Gliazellen, wodurch die Expressionsunterschiede zwischen grauer und weißer Substanz erklärt werden (Rønn et al. 1998).

Die Tumorzone wies entsprechend der makroskopischen Bewertung in 77% der Fälle eine negative oder sehr geringe Expression von NCAM-140 auf. Es ist daher davon auszugehen, dass die zentral gelegenen Tumorzellen in Glioblastomen nahezu kein NCAM-140 exprimieren.

In früheren Untersuchungen der neurochirurgischen Klinik wurde in der Tumorzone von Glioblastomen eine signifikant geringere NCAM-140-Expression beobachtet als in der weißen Substanz des Referenzgewebes (Koblitz 2005, Dünisch 2008). Bei den Analysen dieser Arbeit verhielt es sich umgekehrt. Unterschiede bei der Herstellung der Präparate bestanden nicht. Bei einer Zahl von nur elf bzw. neun Referenzproben in den vorherigen Arbeiten scheint es möglich, dass bei Koblitz und Dünisch kein durchgängig repräsentatives Bild von dem tumorfreien Hirngewebe abgebildet wurde. Tews und Nissen beobachteten eine NCAM-Negativität der Gliazellen tumorfreien Hirngewebes (Tews und Nissen 1998-99).

Die Invasionszone war in der vorliegenden Arbeit entsprechend der makroskopischen Auswertung überwiegend durch eine mittlere NCAM-140-Expression charakterisiert. Die Zellen der Invasionszone zeigten eine signifikant höhere NCAM-140-Expression als die der Tumorzone. Dieses Ergebnis bestätigt die Aussagen von Koblitz und Dünisch (Koblitz 2005, Dünisch 2008). Verschiedene Interpretationsmöglichkeiten kommen für die Beobachtung in Frage, dass die Invasionszone gegenüber der Tumorzone und der tumorfreien weißen Substanz eine deutlich erhöhte NCAM-140-Expression aufwies. Zum einen kann die Invasionszone zu deutlichen Anteilen aus grauer Substanz und damit aus NCAM-140-exprimierenden Neuronen bestanden haben. Andererseits erscheint es möglich, dass die Gliazellen des peritumoralen Hirngewebes reaktiv eine höhere NCAM-140-Expression aufweisen als die Gliazellen tumorfreien Hirngewebes. Daneben kommt in Betracht, dass die NCAM-140-Expression der tumorfreien weißen Substanz gegenüber der Invasionszone aufgrund der Verwendung von Autopsiegewebe vermindert schien.

Letztlich zeigen die beschriebenen Ergebnisse, dass es bei der überwiegenden Zahl der Tumorproben möglich war, anhand der NCAM-140-Expression mit bloßem Auge Tumorzone

und Invasionszone voneinander sowie von tumorfreier grauer Substanz zu unterscheiden. Die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Analyse in den folgenden Kapiteln bestätigen die Beobachtungen der makroskopischen Untersuchungen. Ein klinischer Einsatz der makroskopischen Analysemethode bei neurochirurgischen Eingriffen erscheint daher möglich. Da Glioblastome jedoch keine eindeutige Abgrenzung zum peritumoralen Hirngewebe aufweisen, kann die Verwendung nur einer groben intraoperativen Orientierung dienen.

### **7.3.2 Lichtmikroskopische Auswertung der NCAM-140-Expression**

Im Anschluss an die makroskopische Analyse der NCAM-140-Expression erfolgte eine Untersuchung der Präparate mit einem Lichtmikroskop. Bei 400-facher Vergrößerung wurden für jeden untersuchten Gewebetyp zehn Gesichtsfelder zufällig ausgewählt. Die Expressionsdichte des Antigens wurde dort durch zwei voneinander unabhängige Untersucher subjektiv bestimmt. Das genaue Verfahren ist in Kapitel 5 beschrieben.

Die lichtmikroskopische Untersuchung zeigte der makroskopischen Untersuchung entsprechende Ergebnisse. Die graue Substanz des tumorfreien Referenzgewebes war das am stärksten NCAM-140-positive untersuchte Gewebe mit signifikanten Unterschieden zur weißen Substanz der Referenzproben sowie zur Tumor- und Invasionszone der Glioblastomproben. Die weiße Substanz war durch eine signifikant geringere NCAM-140-Expression gekennzeichnet als alle anderen untersuchten Gewebeanteile.

Die Tumorzone der Glioblastomproben zeigte auch bei lichtmikroskopischer Analyse eine signifikant geringere NCAM-140-Expression als die Invasionszone. Während die Tumorzone in 85% der Proben durch eine negative oder sehr geringe NCAM-140-Expression gekennzeichnet war, zeigte sich in der Invasionszone in 95% der Fälle eine mittlere bis hohe NCAM-140-Expression. In der vorliegenden Arbeit wurde also eine stufenweise abnehmende NCAM-140-Expression von grauer Substanz tumorfreier Referenzproben über die Invasionszone bis hin zur Tumorzone der Glioblastomproben beobachtet. Dies lässt vermuten, dass der Verlust von NCAM-140 eine Rolle bei der Tumorprogression spielt.

In der biomedizinischen Fachliteratur existieren verschiedene Arbeiten, die sich ebenfalls mit der NCAM-Expression in Gliomen befassen. Eine Differenzierung zwischen Tumorzone und Invasionszone erfolgte in diesen jedoch nicht. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich die Ergebnisse daher überwiegend auf die Tumorzone beziehen, insofern eine solche erkennbar war. Die Beobachtungen der einzelnen Publikationen sind zum Teil widersprüchlich.

Mehrere Arbeiten bestätigen die vorliegenden Ergebnisse (Sasaki et al. 1998, Huang et al. 2001, Suzuki et al. 2005, Todaro et al. 2007). Der angegebene Anteil von Glioblastomen mit

negativer oder gering positiver NCAM-Immunreaktivität variiert jedoch stark. Gründe hierfür sind in der Verwendung unterschiedlicher Antikörper zu suchen, die oft nicht zwischen den einzelnen Isoformen von NCAM differenzieren. Daneben könnten die verschiedenen Subtypen der Glioblastome wie beispielsweise kleinzellige und fusiforme Glioblastome sowie Riesenzellglioblastome verschiedene molekulare Ausstattungen aufweisen. Die Abhängigkeit der Antigenexpression von den einzelnen Subtypen sollte in zukünftigen Arbeiten überprüft werden.

Eine Bestätigung starker NCAM-Expression in tumorfreiem Hirngewebe ohne weitere Differenzierung der Isoform findet sich unter anderem in den immunhistochemischen Untersuchungen von Gingras et al. (Gingras et al. 1995).

Durch die Arbeitsgruppe um Sasaki wurde für die verschiedenen Isoformen getrennt eine umgekehrte Korrelation zwischen dem WHO-Grad der Gliome und der NCAM-Expression gezeigt. Die stärkste NCAM-Positivität wurde in den tumorfreien Referenzproben beobachtet. In einer Western-Blot-Analyse war in 63% der acht untersuchten Glioblastome eine schwache oder negative NCAM-140-Expression charakterisierend. Immunhistochemisch waren 75% der vier untersuchten Glioblastome durch eine schwache Expression von NCAM gekennzeichnet. Der in der Immunhistochemie verwendete monoklonale Antikörper war gegen alle drei Hauptisoformen von humanem NCAM gerichtet (Sasaki et al. 1998).

Die Arbeitsgruppe um Huang zeigte in 48 Astrozytomen mit einem monoklonalen Antikörper gegen NCAM eine inverse Korrelation zwischen der NCAM-Expression und dem WHO-Grad der Tumore (Huang et al. 2001). Ein entsprechendes Ergebnis ergab sich bei Todaro et al. bei der Untersuchung von 59 Hirntumoren mit einem Antikörper, der alle drei Hauptisoformen von NCAM erkennt. Glioblastome waren in 35% der 37 untersuchten Proben durch weniger als 25% NCAM-positive Zellen und somit eine schwache Immunreaktivität gekennzeichnet (Todaro et al. 2007).

In der Arbeit von Suzuki et al. waren bei immunhistochemischer Untersuchung 43% von sieben untersuchten Glioblastomen NCAM-negativ. Der Zusammenhang zwischen der NCAM-Expression der untersuchten 44 Astrozytome und deren WHO-Grad wurde nicht statistisch analysiert. Die angegebenen Daten zeigten jedoch auch hier tendenziell eine inverse Korrelation zwischen dem Anteil NCAM-exprimierender Tumore und ihrem WHO-Grad (Suzuki et al. 2005).

Widersprüchliche Ergebnisse zu den eben beschriebenen Publikationen finden sich bei Tews und Nissen. In dieser Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen dem WHO-Grad der astrozytären Gliome und deren NCAM-Expression beobachtet werden. Die untersuchten



Glioblastome zeigten in 73% von 44 Proben eine starke oder sehr starke NCAM-Expression. Der Grund für den Unterschied zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist vermutlich, dass in der Arbeit von Tews und Nissen ein monoklonaler Antikörper verwendet wurde, der neben NCAM-140 auch NCAM-120 und NCAM-180 detektiert (Tews und Nissen 1998-99).

Eine mäßige NCAM-140-Expression stellt entsprechend den vorliegenden Ergebnissen und früheren Publikationen eine Gemeinsamkeit zwischen der Invasionszone und niedriggradigen Astrozytomen dar (Sasaki et al. 1998, Huang et al. 2001, Suzuki et al. 2005, Todaro et al. 2007). Allerdings ist bei Glioblastomen aufgrund eines besonders stark invasiven Wachstums zu vermuten, dass die vorhandenen Tumorzellen in der Invasionszone ein aggressiveres Verhalten und eine geringere NCAM-140-Expression aufweisen, als die Tumorzellen niedriggradiger Astrozytome. Daher könnte der ähnliche Gehalt von NCAM-140 in der Invasionszone gegenüber niedriggradigen Astrozytomen auch daran liegen, dass der Anteil neoplastisch veränderter Zellen in der Invasionszone deutlich geringer ist, als in der Tumorzone der Glioblastome.

### **7.3.3 Darstellbarkeit der Tumorgrenze**

In der vorliegenden Arbeit wurden signifikante Expressionsunterschiede von NCAM-140 zwischen der Tumorzone und der Invasionszone der Glioblastome mit nur sehr geringer oder negativer Antigenexpression in der Tumorzone beobachtet. Darauf aufbauend konnte festgestellt werden, dass in 75,6% der Fälle anhand der NCAM-140-Expression eine scharfe Tumorgrenze oder eine Übergangsform zwischen dieser und einer diffusen Einzelzellinvasion erkennbar war. Für diese Untersuchung standen 41 Proben zur Verfügung.

Eine höhere NCAM-140-Expression der Invasionszone war mit einer besseren Darstellbarkeit der Tumorabgrenzung verknüpft. Teilweise war die Abgrenzung auch makroskopisch darstellbar. Mit Probenzahlen von elf bzw. 25 Glioblastomen wurde in den Arbeiten von Koblitz und Dünisch an der neurochirurgischen Klinik bereits ein ähnliches Ergebnis gezeigt. Beide Arbeiten beschrieben eine in manchen Proben relativ scharfe Tumorgrenze sowie zum Teil eine diffuse Einzelzellinvasion oder eine Invasion scharf abgegrenzter Tumorzellnester (Koblitz 2005, Dünisch 2008). Letzteres Merkmal war in keiner der Proben der vorliegenden Arbeit zu verzeichnen. Der Zusammenhang zwischen der Abgrenzbarkeit des Tumors und der NCAM-140-Expression der Invasionszone wurde in dieser Arbeit erstmalig beobachtet. Er weist insbesondere auf die Relevanz des Aufbaus peritumoralen Hirngewebes für seine Abgrenzbarkeit vom Tumor hin.

Bedeutung könnte die beschriebene Abgrenzbarkeit der überwiegend NCAM-140-negativen Glioblastome unter anderem in der Tumorchirurgie erlangen.

#### **7.4 Ergebnisse der Expressionsanalyse von MMP-2**

Die Expressionsanalyse von MMP-2 erfolgte lichtmikroskopisch entsprechend der bei der Analyse von NCAM-140 angewandten Methode. Neben der Tumorzone und der Invasionszone wurden weitere Gewebeanteile der Glioblastome differenziert betrachtet.

Das tumorfreie Referenzgewebe zeigte sowohl in der grauen als auch in der weißen Substanz abgesehen von den Blutgefäßen eine durchgängige MMP-2-Negativität. Blutgefäße waren in 20 bis 50% der Proben je nach untersuchter Art der Gefäße MMP-2-positiv. Dabei war die Expression von MMP-2 in den Gefäßen der grauen Substanz signifikant stärker als in denen der weißen Substanz. Verschiedene immunhistochemische Untersuchungen anderer Forschungsgruppen bestätigen, dass tumorfreies Hirngewebe, abgesehen von einigen Endothelzellen, kein MMP-2 exprimiert (Sawaya et al. 1996, Tews und Nissen 1998-99, Nakada et al. 1999, Komatsu et al. 2004). MMP-2 in Neuronen, wie sie durch Raithatha et al. anhand der mRNA-Expression beschrieben wurde, fand sich in der vorliegenden Arbeit nicht. Der Nachweis einer Antigenexpression ist in der hier verwendeten RT-PCR in aller Regel sensitiver als in der Immunhistochemie (Raithatha et al. 2000).

Zudem war die MMP-2-Expression der Blutgefäße in den Proben der vorliegenden Arbeit weitgehend auf das Endothel beschränkt, während in der Arbeit von Vince et al. eine schwache Immunreaktivität perivaskulärer Zellen beschrieben wurde. Der geringfügige Unterschied könnte darin begründet sein, dass Vince et al. Operationsmaterial als Referenzproben verwendeten (Vince et al. 1999).

Ein Vergleich zwischen der MMP-2-Expression von Blutgefäßen der grauen und der weißen Substanz ist in der biomedizinischen Fachliteratur bisher nicht beschrieben.

Die MMP-2-Expression der Tumor- und der Invasionszone der Glioblastome war signifikant stärker als die des tumorfreien Referenzgewebes. MMP-2-Positivität war eher mit lokaler Häufung als flächendeckend in Tumorzellen und Zellen der Pseudopalisaden zu verzeichnen. Daneben zeigte sich das Endothel von Blutgefäßen vielfach MMP-2-positiv. Die Tumorzone ohne Berücksichtigung der Zellen der Pseudopalisaden war in 50% der Tumorproben MMP-2-positiv und zeigte eine tendenziell geringere MMP-2-Expression als die Zellen der Pseudopalisaden selbst. Diese waren in 56% der Proben MMP-2-positiv. Der Anteil von Glioblastomen mit MMP-2-Positivität in zumindest einem der beiden Gewebeanteile betrug 69%. Die Zellen der Pseudopalisaden exprimierten signifikant mehr MMP-2 als die

Invasionszone, die in 54% der Proben MMP-2-positiv war. Die besondere Rolle von Zellen der Pseudopalisaden innerhalb der Tumore wird hierdurch betont. Zwischen der Tumorzone ohne Berücksichtigung der Zellen der Pseudopalisaden und der Invasionszone bestanden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der MMP-2-Expression.

In der biomedizinischen Fachliteratur wurde in vielen Arbeiten übereinstimmend mit den vorliegenden Ergebnissen eine erhöhte MMP-2-Expression in Glioblastomen beschrieben (Lampert et al. 1998, Kachra et al. 1999, Jäälinojä et al. 2000, Pagenstecher et al. 2001, Komatsu et al. 2004). In der Arbeit von Jäälinojä et al. war ähnlich den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen eine MMP-2-Expression in 54% der 35 immunhistochemisch untersuchten Glioblastome zu beobachten. Komatsu et al. entdeckte eine MMP-2-Positivität in 45% von elf untersuchten Glioblastomen bei immunhistochemischer Untersuchung und in 55% der Fälle bei einer RT-PCR. Eine MMP-2-Positivität in 100% der Proben war bei der immunhistochemischen Untersuchung von neun Glioblastomen bei Yano et al. zu verzeichnen. Da dieser Wert die MMP-2-Expression der Blutgefäße einschloss, bestanden auch hier zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit keine größeren Unterschiede (Yano et al. 2001).

Bei der Lokalisierung der MMP-2-Expression innerhalb der Glioblastome sind die Ergebnisse verschiedener Publikationen uneinheitlich. Eine intrazytoplasmatische MMP-2-Positivität einzelner Tumorzellen mit oft lokaler Häufung wurde durch einige Arbeiten bestätigt (Tews und Nissen 1998-99, Nakada et al. 1999, Raithatha et al. 2000, Komatsu et al. 2004). Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit beschrieben Vince et al. eine primär extrazelluläre, membranassoziierte MMP-2-Expression um Cluster von Tumorzellen herum. Die Verwendung von Gefrierschnitten könnte für den Unterschied verantwortlich sein (Vince et al. 1999).

In drei Publikationen wurde aufgrund immunhistochemischer Analysen beschrieben, dass MMP-2-positive Zellen vor allem am Rand der Tumormasse in invadierenden Zellen vorkommen (Tews und Nissen 1998-99, Jäälinojä et al. 2000, Komatsu et al. 2004). Zudem konnte in der gelzymographischen Untersuchung von Brat et al. eine fleckige Aktivität von Gelatinasen im Bereich der Infiltrationszone beobachtet werden (Brat et al. 2004). Diese Publikationen bestätigen das Ergebnis der vorliegenden Arbeit, dass auch die Invasionszone von Glioblastomen MMP-2 in besonderem Maße exprimiert. Ein direkter Vergleich zwischen der MMP-2-Expression der Invasionszone und der Tumorzone wurde bisher in der biomedizinischen Fachliteratur nicht beschrieben. Obwohl in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten MMP-2-Expressionsunterschiede zwischen der Tumorzone ohne Berücksichtigung der Zellen der Pseudopalisaden und der Invasionszone bestanden, ist eine besondere Bedeutung von MMP-2 in der Invasionszone anzunehmen. Der Anteil neoplastisch

veränderter Zellen ist in der Invasionszone deutlich geringer als in der Tumorzone. Um ein ähnliches Expressionsniveau beider Areale zu verursachen, muss die MMP-2-Expression in den Tumorzellen der Invasionszone deutlich höher als in denen der Tumorzone sein, insofern nur Tumorzellen MMP-2-exprimieren. Eine alternative Erklärungsmöglichkeit wäre eine reaktive MMP-2-Expression nicht neoplastischer Zellen, doch gibt es Belege dafür, dass die Expression des Proteins eher durch die Gliomzellen erfolgt (Raithatha et al. 2000).

Im Gegensatz zu der ähnlichen MMP-2-Expression von Tumorzone und Invasionszone wurde in vielen Arbeiten eine positive Korrelation zwischen dem WHO-Grad von Gliomen und ihrer MMP-2-Expression beschrieben (Sawaya et al. 1996, Lampert et al. 1998, Nakada et al. 1999, Yano et al. 2001). Es ist daher bei oft deutlicher MMP-2-Positivität der Invasionszone davon auszugehen, dass sich die molekulare Ausstattung der Invasionszone von Glioblastomen deutlich von der niedriggradiger Astrozytome unterscheidet.

Die MMP-2-Expression von Zellen der Pseudopalisaden wurde in den Arbeiten anderer Forschungsgruppen nur vereinzelt untersucht und uneinheitlich beschrieben. Yano et al. beobachteten MMP-2 in einer immunhistochemischen Analyse von neun Glioblastomen in der Umgebung von Nekrosen, die oft durch Pseudopalisaden gekennzeichnet ist (Yano et al. 2001). Vince et al. dagegen konnte bei der Analyse von jeweils acht Proben aus sechs Glioblastomen keine positive MMP-2-Immunreaktivität in diesem Bereich feststellen (Vince et al. 1999). Die geringe Zahl untersuchter Tumore könnte der Grund für den Widerspruch zur vorliegenden Arbeit sein, da die Zellen der Pseudopalisaden auch hier nur in etwa der Hälfte der Proben MMP-2 exprimierten. Eine positive Immunreaktivität von Makrophagen in der Umrandung von Nekrosen wurde bei Jäälinojä et al. beschrieben (Jäälinojä et al. 2000). Da keine genaueren Angaben zu der Identifizierungsmethode der Makrophagen angegeben wurden, scheint eine Verwechslung mit Zellen der Pseudopalisaden möglich. Brat et al. führten eine Gelzymographie durch und verglichen die Ergebnisse mit den zugehörigen H/E-gefärbten Präparaten der Glioblastome. Sie beobachteten eine Gelatinaseaktivität vor allem in Bereichen, die der Lokalisation von Pseudopalisaden entsprachen (Brat et al. 2004). Zumindest ein Teil des exprimierten MMP-2 scheint demnach auch aktiv zu sein.

Ein weitere regelmäßig beschriebene Lokalisation von MMP-2 in Glioblastomen ist das Endothel von Blutgefäßen (Sawaya et al. 1996, Nakada et al. 1999, Vince et al. 1999, Jäälinojä et al. 2000, Yano et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit wiesen 95% der Tumorproben MMP-2-Positivität von Gefäßen auf. Die Expression von MMP-2 war mit Übereinstimmung zu anderen Arbeiten in den Blutgefäßen der Tumorproben signifikant stärker als in denen der tumorfreien Referenzproben (Tews und Nissen 1998-99, Nakada et al. 1999). Einschichtige

Blutgefäße exprimierten signifikant mehr MMP-2 als die mehrschichtigen Gefäße. Zwischen den Blutgefäßen der Tumorzone und der Invasionszone bestanden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der MMP-2-Expression. Ähnliche Ergebnisse wurden in der biomedizinischen Fachliteratur bisher nicht beschrieben.

### **7.5 Ergebnisse der Expressionsanalyse von Faktor X**

Die Expressionsanalyse von Faktor X erfolgte lichtmikroskopisch in Analogie zur Auswertung der MMP-2-Expression. Das tumorfreie Referenzgewebe war in über der Hälfte der Proben Faktor-X-negativ. Proben mit Faktor-X-Positivität der grauen und weißen Substanz zeigten nur eine sehr schwache Expression des Antigens. Signifikante Unterschiede zwischen der grauen und weißen Substanz hinsichtlich der Faktor-X-Expression bestanden nicht. Gegenüber dem Gewebe der Glioblastomproben war von den Zellen der Pseudopalisaden abgesehen eine signifikant geringere Faktor-X-Expression zu verzeichnen. Zwischen den Zellen der Pseudopalisaden und dem Gewebe der Referenzproben bestanden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Faktor-X-Expression.

In der biomedizinischen Fachliteratur befassen sich nur wenige Publikationen mit der Faktor-X-Expression in Hirngewebe bzw. Hirntumoren. Die Arbeit von Yamada et al. untersuchte immunhistochemisch die Expression von Faktor X in humanem tumorfreiem Hirngewebe. Das verwendete Gewebe stammte von sieben Personen, bei denen in vier Fällen neurologische Erkrankungen bekannt waren. In der grauen Substanz wurden keine Faktor-X-positiven Zellen gefunden. Demgegenüber konnte eine positive Immunreaktivität in manchen Hirnstammneuronen beobachtet werden. Zudem war Mikroglia, die 10-20% der glialen Zellen des Hirns ausmacht, Faktor-X-positiv. Die weiße Substanz exprimierte ebenso geringe Mengen des Faktors X, insbesondere im Gewebe eines Patienten mit Alzheimererkrankung. Die Autoren zogen in Erwägung, dass es sich hierbei um eine Aufnahme von Plasmaproteinen in geschädigte Neurone gehandelt haben könnte (Yamada und Nagai 1996). Die vorliegende Arbeit zeigte jedoch sowohl in grauer als auch weißer Hirnsubstanz mehrerer Referenzproben eine schwache Faktor-X-Expression, die unter anderem Gliazellen betraf und damit nicht allein von neuronalen Prozessen abhängig war. Eine geringe Expression von Faktor X scheint demnach für tumorfreies Hirngewebe nicht untypisch zu sein.

In der Arbeit von Shikamoto und Morita wurde ebenfalls eine schwache Expression von Faktor X in tumorfreiem Hirngewebe beobachtet, doch handelte es sich bei dem untersuchten Gewebe um Rattenhirn. Die in einer RT-PCR detektierte mRNA war im Zerebrum und im Zerebellum lokalisiert. Eine genauere Lokalisation der Faktor-X-Expression war in dieser Studie nicht

möglich. Die Autoren beschrieben jedoch, dass sie in einer früheren unveröffentlichten Studie die Expression von mRNA für Faktor X in kultivierten Astrozyten beobachteten. Ein Vergleich des tumorfreien Hirngewebes mit der Faktor-X-Expression der humanen Glioblastomzelllinie A172 zeigte eine zweieinhalbfach stärkere Expression des Antigens in dem tumorfreien Hirngewebe (Shikamoto und Morita 1999). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit und könnte insbesondere durch den Vergleich mit Rattenhirn verursacht sein. Zudem stellt die untersuchte Glioblastomzelllinie möglicherweise ein Beispiel mit geringer Faktor-X-Expression dar.

Bei der Untersuchung der Glioblastomproben wurde in der vorliegenden Arbeit festgestellt, dass die Zellen ähnlich dem Muster der MMP-2-Expression Faktor X mit lokaler Häufung exprimierten. Der Anteil Faktor-X-positiver Glioblastome betrug für die Tumorzone 92% und für die Invasionszone 76%. Die Tumorzone ohne Berücksichtigung der Zellen der Pseudopalisaden zeigte gegenüber der Invasionszone eine signifikant höhere Expressionsdichte von Faktor X. Der unterschiedliche Anteil von Tumorzellen in beiden Arealen ist als verursachender Faktor für dieses Ergebnis nicht auszuschließen. Die Zellen der Pseudopalisaden wiesen eine signifikant geringere Faktor-X-Expression auf als die übrige Tumorzone bzw. die Invasionszone.

Dass Glioblastome in besonderem Maße Faktor X exprimieren, ist gerade im Hinblick auf die in jüngster Zeit beobachteten PAR-vermittelten Wirkungen der Gerinnungsfaktoren ein besonderes, bisher in der biomedizinischen Fachliteratur nicht beschriebenes Ergebnis.

Eine Reihe anderer Tumore wurde auf die Expression von aktiviertem Faktor X bereits untersucht. Faktor Xa wurde immunhistochemisch auf Tumorzellen von kleinzelligen Lungenkarzinomen, Nierenzellkarzinomen und malignen Melanomen detektiert, während normales Lungen- und Nierengewebe nur geringe Mengen des Antigens aufwies (Zacharski et al. 1991). Dieser Aspekt bestärkt die Vermutung, dass Faktor X eine Rolle bei der Progression verschiedener Tumore zukommen scheint.

Das Endothel von Blutgefäßen war in 69% der Glioblastomproben Faktor-X-positiv. Die Expression von Faktor X war hier signifikant höher als in den Gefäßen des Referenzgewebes, das nur in zwei der 19 Proben eine geringe Expression des Antigens in einzelnen Blutgefäßen aufwies. Einschichtige Blutgefäße der Tumor- bzw. der Invasionszone zeigten eine signifikant stärkere Faktor-X-Expression als die mehrschichtigen Gefäße. Eine Expression von Faktor X in Blutgefäßen von Glioblastomen wurde bisher nicht beschrieben, so dass ein Vergleich mit anderen Arbeiten derzeit nicht möglich ist.



## **7.6 Zusammenhänge zwischen der Expression von NCAM-140, MMP-2 und Faktor X**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass NCAM-140, MMP-2 und der Gerinnungsfaktor X Proteine darstellen, deren Expressionsmenge in Glioblastomen gegenüber tumorfreiem Hirngewebe verändert ist. Ein Vergleich zwischen der Expression dieser Proteine zeigte einen statistisch nicht signifikanten, jedoch im Trend erkennbaren inversen Zusammenhang zwischen der NCAM-140-Expression und der MMP-2-Expression der Invasionszone. Eine stärkere Expression von MMP-2 korrelierte demnach mit einer geringeren NCAM-140-Expression. Dass dieses Ergebnis in der Tumorzone nicht beobachtet werden konnte, liegt vermutlich an der überwiegend negativen oder sehr geringen NCAM-140 Expression, die jedoch einer deutlich erhöhten MMP-2-Expression gegenüberstand. Ein vergleichbares Ergebnis findet sich bei Maidment et al. Hier wurde eine inverse Korrelation zwischen der Expression von NCAM-180 und von MMP-2 in sechs Gliomzelllinien beobachtet. Das Ursprungsgewebe von zwei dieser Zelllinien entstammte Glioblastomen. Der in der Arbeit verwendete Antikörper gegen NCAM detektierte jedoch insbesondere NCAM-180, NCAM-140 dagegen kaum. Eine Aussage über letztere Isoform war demnach nicht möglich (Maidment et al. 1997). Tews und Nissen konnten keine Korrelation zwischen der Expression von NCAM und MMP-2 verzeichnen (Tews und Nissen 1998-99). Ein möglicher Grund für dieses Ergebnis könnte die fehlende Differenzierung zwischen den NCAM-Isoformen sein.

Insofern ein wirklicher Zusammenhang zwischen der Expression von MMP-2 und NCAM-140 besteht, so stellt sich die Frage, ob es sich um einen kausalen Zusammenhang handelt und welches der beiden Proteine die Expression des anderen beeinflusst. Edvardsen et al. transfizierten in einer Studie die NCAM-negative Rattengliomzelllinie BT4C<sub>n</sub> mit NCAM-140 und untersuchte die resultierende Expression verschiedener Matrixmetalloproteinasen. NCAM-140 bewirkte eine Herunterregulation von MMP-9 und MMP-1. Die Expression von MMP-2 blieb dagegen unbeeinflusst (Edvardsen et al. 1993). Die Arbeitsgruppe um Hübschmann beobachtete einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von NCAM und MMP auf einem anderen Niveau als dem Expressionslevel. In der Arbeit zeigte sich, dass NCAM von primären hippocampalen Neuronen in Kultur durch extrazelluläre MMPs abgespalten werden kann. Das Auswachsen der Neuronen wurde hierdurch ermöglicht (Hübschmann et al. 2005). Möglicherweise hat dieser Mechanismus auch im Rahmen der Tumorprogression eine Bedeutung.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit beobachtet, dass eine stärkere Expression von MMP-2 in den Zellen der Pseudopalisaden mit einer stärkeren Expression von Faktor X assoziiert war. Ein funktioneller Zusammenhang zwischen beiden Proteinen im Rahmen der Entstehung von Pseudopalisaden ist daher möglich. Allerdings war die Expression von Faktor X in den Zellen der Pseudopalisaden insgesamt sehr niedrig und zeigte keine signifikanten Unterschiede zum tumorfreien Referenzgewebe. Es ist daher nicht auszuschließen, dass der beobachtete Zusammenhang rein zufälliger Art ist.

Anders verhielt es sich bei den einschichtigen Blutgefäßen der Tumorzone. Eine stärkere Expression von MMP-2 war hier mit einer stärkeren Faktor-X-Expression assoziiert. Das Expressionsniveau beider Antigene war gegenüber den Blutgefäßen der tumorfreien Referenzproben deutlich erhöht.

In der biomedizinischen Fachliteratur beschreiben bisher nur wenige Arbeiten einen direkten Zusammenhang zwischen der Expression von MMP-2 und Faktor X bzw. deren Aktivierung. Die Arbeitsgruppe um Rauch beobachtete, dass auf glatte Gefäßmuskelzellen einwirkender aktivierter Faktor X (Faktor Xa) die Freisetzung aktivierter MMP-2 sowie die Aktivierung von inaktiv vorliegendem MMP-2 induzierte. Dieser Zusammenhang zeigte sich als abhängig von der Konzentration des Faktors X, der in aktivierter Form vorliegen musste. Zudem war die Aktivierung scheinbar membrangebunden. Es stellt sich also die Frage, ob Faktor Xa den trimerischen Komplex aus mt1-MMP, TIMP-2 und MMP-2 beeinflusst (Rauch et al. 2002).

In ähnlicher Weise wurde durch Borensztajn et al. beschrieben, dass Faktor Xa Fibroblasten zur Bildung von inaktivem MMP-2 stimuliert und Matrixmetalloproteinasen zu aktivieren vermag (Borensztajn et al. 2008).

Mögliche Signalwege für die Effekte von Faktor Xa auf MMP-2 könnten sowohl die Bildung von Thrombin als auch die Aktivierung von PAR-1 und PAR-2 darstellen. Die Arbeiten von Nierodzik et al. und Furukawa et al. beschreiben eine Steigerung der Expression von MMP-2 bei Stimulation von Zellen mit Thrombin. Dabei wurde von der Arbeitsgruppe um Furukawa vermutet, dass Thrombin seine Wirkung über die Aktivierung von PAR-1 entfaltet (Nierodzik et al. 2006, Furukawa et al. 2008). Ein Beleg für die PAR-1- bzw. PAR-2-induzierte Aktivierung von MMP-2 mit einem bis zu siebenfach erhöhten Aktivitätsniveau findet sich bei Wilson et al. (Wilson et al. 2004).

Ein weiterer möglicher Zusammenhang zwischen MMP-2 und Faktor X könnte über die Wirkmechanismen bestehen, da auch für Matrixmetalloproteinasen die Fähigkeit zur Spaltung von PARs beschrieben wird. Boire et al. konnten den Effekt bisher allerdings nur für MMP-1 an PAR-1 zeigen, während MMP-2 nur zu einer geringen Spaltung der Rezeptoren mit

fehlender zellulärer Reaktion führte (Boire et al. 2005). In der Zukunft sollte auch die Wirkung von Matrixmetalloproteinasen auf andere Typen von PARs untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen der Expression von NCAM-140 und Faktor X beobachtet werden. Die Arbeitsgruppe um Senden beobachtete, dass Faktor Xa die Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 in Endothelzellen erhöhte (Senden et al. 1998). Eine Untersuchung der Wirkung auf NCAM findet sich jedoch weder in dieser, noch in anderen bisher veröffentlichten Arbeiten.

### **7.7 Tumorbilologische Bedeutung der untersuchten Antigene**

Während NCAM-140 ein Molekül der Zelloberfläche darstellt, für das keine Expression einer inaktiven Form beschrieben ist, handelt es sich bei MMP-2 und Faktor-X um Proteasen, die einer Aktivierung bedürfen und mit Inhibitoren im Gleichgewicht stehen (Linnemann und Kühl 2002, Löffler und Petrides 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnte das Vorhandensein aktiver Formen von MMP-2 und Faktor X durch die verwendeten Antikörper nicht isoliert überprüft werden. In der biomedizinischen Fachliteratur werden jedoch für beide Proteasen Aktivierungsmöglichkeiten innerhalb von Tumorgewebe beschrieben. Neben der im Kapitel 7.6 erwähnten Möglichkeit der Aktivierung von MMP-2 durch Faktor Xa oder Thrombin scheint der klassische Aktivierungsweg von MMP-2 auch in Astrozytomen von Bedeutung zu sein. Lampert et al. beschrieben eine Korrelation zwischen der Expression von mt1-MMP, das bei der normalen Aktivierung einen Komplex mit MMP-2 bildet, und dem WHO-Grad von Gliomen (Lampert et al. 1998). Die Arbeitsgruppe um Nakada et al. beobachtete eine Korrelation zwischen der erhöhten mt1-MMP-Expression in Astrozytomen und der Aktivierung von MMP-2. Eine Kolo-kalisation beider Proteine wurde verzeichnet (Nakada et al. 1999). Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine positive Korrelation zwischen der immunhistochemisch detektierten MMP-2-Expression und der Aktivität dieser Protease besteht (Nakagawa et al. 1996).

Interessanterweise könnte die Aktivierung von MMP-2 jedoch nicht nur durch die Gliomzellen, sondern auch durch nicht neoplastische Astrozyten des peritumoralen Hirngewebes gefördert werden. In einer Kokultur von Astrozyten und Gliomzellen war eine stärkere Aktivierung von MMP-2 als im Vergleich zu einer getrennten Kultur zu beobachten (Le et al. 2003).

Die Aktivierung von Faktor X im Gewebe des Tumors kann wie bei der physiologischen Blutgerinnung durch einen Komplex aus Gewebefaktor und Faktor VIIa erfolgen (Leadley JR jr

et al. 2001). Gewebefaktor wird in höhergradigen Gliomen in verstärktem Maße exprimiert (Fernandes et al. 2006). Der Faktor VIIa könnte durch Diffusion aus den Blutgefäßen in das Tumorgewebe gelangen, da die Gefäßwandpermeabilität in Glioblastomen unter anderem über die Bildung von VEGF erhöht ist (Brat und Van Meir 2004).

Über den klassischen Weg hinaus kann die Aktivierung von Faktor X durch die Cysteinprotease, einem oft in malignem Gewebe exprimiertem Enzym, erfolgen (Leadley JR jr et al. 2001).

Als Inhibitor von MMP-2 wirkt insbesondere TIMP-2, dessen Expressionsmuster in Gliomen ebenso wie das der MMP-2 verändert ist (Nakagawa et al. 1996). Kachra et al. beobachteten eine inverse Korrelation zwischen dem WHO-Grad von Gliomen und ihrer TIMP-2-Expression, wodurch das Gleichgewicht zwischen der Aktivität und Inhibition von MMP-2 noch weiter zugunsten der Aktivität verschoben wird (Kachra et al. 1999). Dagegen beschrieb Lampert et al. eine vom WHO-Grad unabhängige Hochregulation der TIMP-2-Expression in Gliomen (Lampert et al. 1998). Da TIMP-2 bis zu einer begrenzten Menge die Aktivierung von MMP-2 fördert, könnte auch diese Konstellation die Progression des Tumors insbesondere in höhergradigen Glioblastomen unterstützen (Lu et al. 2004).

Aufgrund der genannten Belege für die Möglichkeit einer Aktivierung von MMP-2 und Faktor X in Gliomen ergibt sich im Folgenden für beide Proteasen sowie auch für NCAM-140 die Frage, welche Auswirkungen ihre veränderte Expression in Glioblastomen hat.

Zu den wichtigen Faktoren der Tumorprogression zählen unter anderem das Wachstum, die Angiogenese und die Invasion des Tumors in das peritumorale Hirngewebe. Daneben belegen verschiedene Publikation, dass auch die Bildung von Pseudopalisaden in Glioblastomen eine besondere Rolle zu spielen scheint.

In der vorliegenden Arbeit war eine sehr geringe oder fehlende Expression von NCAM-140 in der deutlich proliferierenden Tumorzone zu beobachten. Dagegen war die NCAM-140-Expression in der Invasionszone, die durch eine wesentliche geringere Zellproliferation charakterisiert ist, signifikant höher. Der daraus zu vermutende Zusammenhang, dass eine inverse Korrelation zwischen der NCAM-140-Expression und der Proliferation von Zellen besteht, wurde in der Untersuchung von Astrozyten sowohl in vitro als auch in vivo bestätigt (Krushel et al. 1995, Sporns et al. 1995). Die Arbeitsgruppe um Edvardsen beobachtete ebenfalls verminderte Wachstumsraten bei der Untersuchung der mit NCAM-140-transfizierten Rattengliomzelllinie BT4C<sub>n</sub>. Als mögliche Ursache diskutierten die Autoren die heterophile Bindung von NCAM an Killerzellen der Ratten mit zytolytischen Interaktionen in der Folge.

Demnach sind die Veränderungen von NCAM wahrscheinlich Ursache und nicht Folge der Proliferationsänderung (Edvardsen et al. 1994).

Eine erhöhte Expression von MMP-2 und Faktor X wurde in der vorliegenden Arbeit überwiegend in Gewebeanteilen mit einer stärkeren Proliferation beobachtet. In weniger proliferierenden Gewebeanteilen wurden die beiden Proteine meist nur in sehr geringem Maße detektiert. Daher scheinen auch sie eine Bedeutung für das Tumorstadium zu besitzen. Mehrere Publikationen beschrieben eine Korrelation zwischen einer erhöhten MMP-2-Expression und einer erhöhten Proliferationsrate von Gliomen (Nakagawa et al. 1996, Vince et al. 1999, Kargiotis et al. 2008). In anderen Arbeiten dagegen wurde eine inverse Korrelation zwischen der MMP-2-Expression und der Proliferation der Zellen beobachtet (Thier et al. 2000, Kunishio et al. 2003). Einen möglichen Grund für diesen scheinbaren Widerspruch beschrieben Thier et al. in ihrer Arbeit. Sie vermuteten dass die einzelnen Zellen entweder Proteinsynthese betreiben und Proteine wie MMP-2 produzieren oder proliferieren, jedoch ohne dass die beiden Vorgänge zeitgleich ablaufen (Thier et al. 2000). Somit kann eine Subpopulation von Zellen durch die Bildung von MMP-2 Platz für das Wachstum schaffen und die Invasion von Tumorzellen vorbereiten, während eine andere Subpopulation den Tumor durch Proliferation vergrößert. Im Gesamtgewebe würde daher die MMP-2-Expression mit der Proliferation korrelieren, während die Korrelation auf Einzelzellebene invers wäre. Dieses Phänomen würde auch die in der vorliegenden Arbeit oft lokal gehäufte, aber selten flächig auftretende MMP-2-Expression erklären.

Faktor Xa hat sich als Wachstumsfaktor erwiesen und wirkt unter anderem auf glatte Muskelzellen von Arterien sowie auf Fibroblasten proliferationsfördernd (Leadley JR jr et al. 2001, Borensztajn et al. 2008). Ebenso kann er das Wachstum von Gliomen und anderen Tumoren über die Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin unterstützen (Ornstein et al. 2002, Nierodzik et al. 2006). Im Gegensatz dazu beschrieben Okamoto et al., dass eine Aktivierung von PAR-2, wie Faktor X sie bewirken könnte, in einer Glioblastomzelllinie zu einer signifikanten Proliferationshemmung führte (Okamoto et al. 2001). Allerdings kann die Aktivierung von PARs durch unterschiedliche Agonisten verschiedene Reaktionen hervorrufen, so dass die Wirkung des für die Versuche verwendeten Agonisten möglicherweise nicht mit der von Faktor Xa übereinstimmt (Borensztajn et al. 2008). Vermutlich sind Korezeptoren an der Bestimmung der Spezifität von PARs beteiligt (Ruf et al. 2003).

Für die Vergrößerung der Masse vitalen Tumorgewebes ist neben der Proliferation auch die Lebensdauer der Zellen von Bedeutung. In der Arbeit von Borensztajn et al. wurde beobachtet, dass Faktor Xa das Überleben von Fibroblasten verlängerte, während es die Überlebenszeit

verschiedener Tumorzelllinien durch Apoptose verminderte. Auf die Lebensdauer von Monozyten und Endothelzellen zeigte dieser Gerinnungsfaktor keinen Einfluss (Borensztajn et al. 2007). Die zukünftige Überprüfung einer möglichen Apoptoseinduktion durch Faktor X in Gliomzellen wäre für das weitere tumorbiologische Verständnis unter der Beobachtung einer vermehrten Faktor-X-Expression in der stark proliferierenden Tumorzone nützlich.

Die Entstehung von Pseudopalisaden am Rand einer Nekrosezone scheint durch Hypoxie verursacht zu werden. Neben einem erhöhten Gewebedruck durch Ödeme, einer Tumorzelleinwanderung in Blutgefäße oder die Rückbildung von Gefäßen durch Apoptose der Endothelzellen kommt eine lokale Thrombose als Grund der Hypoxie in Frage (Brat und Van Meir 2004). In der vorliegenden Arbeit waren die Zellen der Pseudopalisaden durch eine schwache Expression von Faktor X gekennzeichnet. Daher ist eine direkte Verknüpfung zwischen der dortigen Expression des Gerinnungsfaktors und einem Gefäßverschluss über den klassischen Gerinnungsweg eher unwahrscheinlich. Die Expression von Faktor X in den Endothelzellen von Blutgefäßen war dagegen oft ausgeprägt. Inwiefern die Expression in diesem Gewebeanteil mit einer erhöhten Thromboseneigung verknüpft ist, gilt es in weiteren Arbeiten zu klären, da die meisten Gefäße der Glioblastome Faktor-X-positiv sind. Es bliebe damit unklar, weshalb nur einzelne Gefäße zur Induktion einer Nekrose führen.

Die These der Arbeitsgruppe um Brat beinhaltet, dass es in Folge einer Hypoxie zur zentrifugalen Migration einer Subpopulation von Zellen kommt, die als Pseudopalisaden imponieren. Die am Ort verbleibenden Zellen nekrotisieren. Somit werden Zellen selektiert, die durch eine nachweislich erhöhte Migrationsfähigkeit charakterisiert sind. Zudem sind sie durch eine erhöhte Expression von MMP-2, wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, und somit eine verbesserte Invasionsfähigkeit gekennzeichnet (Brat et al. 2004, Brat und Van Meir 2004). Da deshalb eine dichte Sammlung invasionsfähiger Zellen der Pseudopalisaden einer lockeren Verteilung infiltrierender Zellen der Invasionszone gegenübersteht, ist der signifikante Unterschied zwischen der MMP-2-Expression beider Gewebeanteile erklärbar.

Die Arbeitsgruppe um Ben-Yosef konnte an Endothelzellkulturen zeigen, dass eine Hypoxie insbesondere bei nachfolgender Reoxygenierung zu verstärkter MMP-2-Bildung und -aktivierung führt (Ben-Yosef et al. 2002, Ben-Yosef et al. 2005). Allerdings kann man aufgrund der Arbeit von Du et al. vermuten, dass die Bildung von MMP-2 nicht nur Folge, sondern auch Ursache der Entstehung von Pseudopalisaden ist. Hier wurde in MMP-2-freien



Glioblastomen in einer MMP-2-freien Umgebung das Fehlen von Nekrosen und Pseudopalisaden verzeichnet (Du et al. 2008).

Ein zusätzlicher Aspekt der Pseudopalisadenentstehung ist die hypoxiebedingte Bildung von VEGF, das die Neoangiogenese in der Tumorperipherie fördert (Brat und Van Meir 2004).

Doch auch auf direktem Wege sind Zusammenhänge zwischen der MMP-2-Expression und der Neoangiogenese zu vermuten. In einschichtigen Blutgefäßen, die neu gebildete Gefäße vermutlich einschließen, wurde MMP-2 in den Glioblastomproben der vorliegenden Arbeit in besonderem Maße detektiert. Diese Protease kann die Angiogenese unter anderem durch Abbau vaskulärer Basalmembranen unterstützen (Raithatha et al. 2000). Ihre besondere Bedeutung für diese Funktion wurde in den Knockout-Experimenten von Du et al. gezeigt. Insofern kein MMP-2 vorhanden war, stieg die Gefäßdichte zwar deutlich an, doch nahm die Apoptose der Tumorzellen zu, da es sich um nicht funktionelle, schlecht perfundierte Blutgefäße handelte (Du et al. 2008).

Auch eine starke Faktor-X-Expression konnte in der vorliegenden Arbeit in Blutgefäßen der Tumorproben beobachtet werden. Über PAR-2 kommen Faktor X Aufgaben im vaskulären Remodeling zu. Er fördert über diesen Weg die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen und die Umwandlung von Fibroblasten in Myofibroblasten, sowie die Bildung von VEGF durch Fibroblasten (Borensztajn et al. 2008). Zudem wirkt Faktor X in Malignomen mitogen auf Endothelzellen und verstärkt den Abbau eines Angiogeneseinhibitors (Wojtukiewicz et al. 2001).

Die Invasion von Glioblastomen in das peritumorale Hirngewebe stellt einen mehrstufigen Vorgang dar. Zur Überwindung einer extrazellulären Barriere müssen sich Tumorzellen an diese anlagern, einen Defekt des Gewebes durch Proteolyse verursachen und schließlich durch diesen hindurch migrieren (Liotta et al. 1982). Eine besonders bevorzugte Invasionsroute ist die Basalmembran vaskulärer Strukturen, die selbst eine effektive Barriere für die Gliomzellinvasion bildet, den Tumorzellen jedoch eine effektive Anlagerung ermöglicht (Giese et al. 1998, Tonn und Goldbrunner 2003). Durch Überexpression von NCAM-140 wurde bei Owens et al. die Behinderung einer weiträumigen Invasion beobachtet (Owens et al. 1998). Fehlte MMP-2 in Glioblastomen, so war neben einer Verminderung der Invasion in das Hirnparenchym eine zusätzliche Verstärkung der Invasivität entlang von Blutgefäßen zu beobachten (Du et al. 2008). Die Expression verschiedener Proteine scheint daher nicht nur die Invasivität des Tumors an sich, sondern auch das Invasionsmuster zu beeinflussen.

Eine Förderung der Zelldisaggregation und eine Steigerung effizienter Motilität erfolgt unter anderem über eine verminderte NCAM-Expression, wie sie in der vorliegenden Arbeit für NCAM-140 in den Glioblastomproben gezeigt wurde (Gratsa et al. 1997, Maidment et al. 1997, Prag et al. 2002). Die Kapazität zur Erzeugung von Metastasen zeigte sich in NCAM-positiven Rattengliomzellen BT4C als vermindert gegenüber der NCAM-negativen Linie BT4C<sub>n</sub> (Andersson et al. 1991). Wird NCAM auf Zellen exprimiert, so werden diese demnach scheinbar durch eine erhöhte interzelluläre Adhäsion immobilisiert. Zudem wurde ein lokal begrenztes Wachstum mit scharfer Demarkierung der Grenze zwischen Tumor und normalem Hirngewebe nach Transfektion von Gliomzellen mit NCAM beschrieben (Edvardsen et al. 1994). Dieses Phänomen ist konform zu der in der vorliegenden Arbeit oftmals relativ scharf erkennbaren Abgrenzung zwischen der weitgehend NCAM-140 negativen Tumorzone und der deutlich NCAM-140-positiven Invasionszone. Eine erhöhte NCAM-140-Expression der Invasionszone in Glioblastomen scheint dabei die Invasion einzuschränken und somit zu einer Korrelation mit der Abgrenzbarkeit des Tumors vom peritumoralen Hirngewebe zu führen.

Im Rahmen der Invasion kommt den Matrixmetalloproteinasen bei den proteolytischen Vorgängen die größte Bedeutung zu (Chintala et al. 1999). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte MMP-2 ist ein Vertreter, der neben der Degradierung der Extrazellulärmatrix die Ablösung einzelner Zellen aus dem Tumorzellverband sowie deren Migration ermöglicht (Tews und Nissen 1998-99, Raithatha et al. 2000, Kargiotis et al. 2008). Insbesondere die Einflüsse auf die Extrazellulärmatrix und auf die Migration gehen konform mit einer in dieser Arbeit erwogenen verstärkten MMP-2-Expression der Tumorzellen der Invasionszone. Inwiefern die Migrationssteigerung ebenso wie bei MMP-1 über die Aktivierung von PAR-1 erfolgt oder andere Signalmechanismen nutzt, gilt es in der Zukunft zu klären (Boire et al. 2005).

Die Möglichkeit der Aktivierung von PARs durch Faktor X ist dagegen nachgewiesen (Camerer et al. 2000). Eine Invasionssteigerung durch Faktor X, dessen verstärktes Vorkommen in Glioblastomen in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, ist über diesen Mechanismus denkbar. Insbesondere scheinen PAR-1 und PAR-2 für die Migrationsaktivierung durch Faktor Xa bedeutsam zu sein und einen von der Thrombinbildung unabhängigen Wirkmechanismus darzustellen (Jiang et al. 2004, Morris et al. 2006). Eine Bildung von Thrombin durch Faktor Xa kann zusätzlich prometastatisch wirken (Borensztajn et al. 2008). Unter anderem wurde bereits bei picomolaren Konzentrationen von Thrombin eine Veränderung der Astrozytenmorphologie von einem sternförmigen Aussehen zu einer flachen epithelialen Form beobachtet, die mechanische Barrieren vermutlich leichter überwinden kann (Grand et al. 1996).

Einzelne Publikationen der biomedizinischen Fachliteratur beschreiben für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proteine neben ihrer tumorbiologischen Relevanz Aspekte ihrer Bedeutung für die klinische Betreuung der Patienten. Todaro et al. beobachteten, dass der Quotient aus höhermolekularem löslichem NCAM und niedermolekularem löslichem NCAM im Blut mit einer Sensitivität von 59% und einer Spezifität von 80% das Vorhandensein eines Hirntumors nachweisen konnte. Er könnte somit als diagnostischer Marker dienen. Ein Zusammenhang mit dem Überleben der Patienten bestand jedoch nicht (Todaro et al. 2007).

Eine Verbindung zwischen Faktor X und der Therapie von Gliompatienten wurde von Ornstein et al. festgestellt. Niedermolekulares Heparin, das insbesondere die Aktivität von Faktor X hemmt, schien unabhängig von der Antikoagulation antikarzinomatische Aktivität zu besitzen (Ornstein et al. 2002). Dies könnte einen Rückschluss auf die Relevanz von Wirkmechanismen des Faktors X zulassen, die über PARs aktiviert werden.

Für MMP-2 in Gliomen fanden sich Angaben zur Prognose der Patienten. Jäälinoja et. al. beobachteten die Tendenz einer inversen Korrelation zwischen Patientenüberleben und MMP-2-Expressionsstatus (Jäälinoja et al. 2000). Der Nachweis einer signifikant erhöhten MMP-2-Expression in Gliomen mit primär nachgewiesener neoplastischer Dissemination oder Rezidiv untermauert diesen Zusammenhang (Komatsu et al. 2004).

## 8 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von NCAM-140, MMP-2 und Faktor X in der Tumor- und der Invasionszone humaner Glioblastome untersucht und miteinander verglichen. In einigen Aspekten konnte gezeigt werden, dass signifikante Unterschiede zwischen der molekularen Ausstattung beider Zonen der Tumore bestehen. Die analysierten Proteine sind demnach an der Abgrenzbarkeit des Tumors von der peritumoralen Invasionszone beteiligt.

In der Zukunft sollten daher weitere Proteine und Charakteristika beider Tumorbereiche miteinander verglichen werden.

Durch die Detektion von NCAM-140 konnte in der vorliegenden Arbeit in vielen Fällen eine scharfe Abgrenzbarkeit der Tumorzone von der Invasionszone lichtmikroskopisch dargestellt werden. Eine überwiegende NCAM-140-Negativität der Tumorzone stand dabei einer mäßigen Expression des Antigens in der Invasionszone gegenüber. Es gab zudem deutliche Belege dafür, dass die makroskopische Bewertung der NCAM-140-Detektion mindestens einer groben Orientierung bei der Unterscheidung von Tumorzone und Invasionszone dienen kann.

Ein Teil der beobachteten Unterschiede zwischen den beiden Zonen der Glioblastome könnte durch den geringeren Anteil an Tumorzellen in der Invasionszone bedingt sein, da diese durch das eigentliche Wirtsgewebe geprägt ist, das vom Tumor infiltriert wird. Dies wäre jedoch ein Beleg dafür, dass der Tumor in einem relevanten Maße vom umgebenden peritumoralen Hirngewebe abgrenzbar ist. Andererseits ist anzunehmen, dass beispielsweise die Expression von MMP-2 durch Tumorzellen erfolgt. Zwischen Tumor- und Invasionszone wäre daher bei alleiniger Abhängigkeit von der Zellzusammensetzung ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der MMP-2-Expression zu erwarten, wie er in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet wurde. In beiden Zonen konnte eine deutliche Expression von MMP-2 beobachtet werden, das vielfältige Funktionen im Rahmen der Tumorprogression übernehmen kann.

Außerdem konnte in dieser Arbeit die besondere Bedeutung der Zellen der Pseudopalisaden am Rande von Nekrosezonen weiter untermauert werden. Insbesondere die Expression von MMP-2 in diesem Bereich wurde zwar bereits in vielfältigen Publikationen der biomedizinischen Fachliteratur beschrieben, jedoch nie explizit mit der Expression in der übrigen Tumorzone bzw. in der Invasionszone verglichen.

Eine Faktor-X-Expression war in der vorliegenden Arbeit erstmalig in der Tumorzone von Glioblastomen und mit absteigenden Anteilen in der Invasionszone und dem tumorfreien Referenzgewebe zu beobachten. Für die Klärung seiner Bedeutung im Rahmen der Tumorprogression bedarf es weiterer Untersuchungen wie beispielsweise der Analyse des Expressionsstatus von PARs in den entsprechenden Tumorabschnitten.

## 9 Literaturverzeichnis

- Amoreux MC, Cunningham BA, Edelman GM, Crossin KL. 2000. N-Cam binding inhibits the proliferation of hippocampal progenitor cells and promotes their differentiation to a neuronal phenotype. *J Neurosci*, 20(10):3631-3640
- Andersson AM, Moran N, Gaardsvoll H, Linnemann D, Bjerkvig R, Laerum OD, Bock E. 1991. Characterization of NCAM Expression and Function in BT4C and BT4C<sub>n</sub> Glioma Cells. *Int J Cancer*, 47(1):124-129
- Béliveau R, Delbecchi L, Beaulieu E, Mousseau N, Kachra Z, Berthelet F, Moumdjian R, Del Maestro R. 1999. Expression of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Brain Tumors. *Ann N Y Acad Sci*, 886:236-239
- Ben-Yosef Y, Lahat N, Shapiro S, Bitterman H, Miller A. 2002. Regulation of Endothelial Matrix Metalloproteinase-2 by Hypoxia/Reoxygenation. *Circulation Research*, 90(7):784-791
- Ben-Yosef Y, Miller A, Shapiro S, Lahat N. 2005. Hypoxia of endothelial cells leads to MMP-2-dependent survival and death. *Am J Physiol Cell Physiol*, 289(5):1321-1331
- Boire A, Covic L, Agarwal A, Jacques S, Sherifi S, Kuliopulos A. 2005. Par-1 Is a Matrix Metalloproteinase-1 Receptor that Promotes Invasion and Tumorigenesis of Breast Cancer Cells. *Cell*, 120(3):303-313
- Borensztajn KS, Bijlsma MF, Groot AP, Brüggemann LW, Versteeg HH, Reitsma PH, Peppelenbosch MP, Spek CA. 2007. Coagulation factor Xa drives tumor cells into apoptosis through BH3-only protein Bim up-regulation. *Exp Cell Res*, 313(12):2622-2633
- Borensztajn KS, Peppelenbosch MP, Spek CA. 2008. Factor Xa: at the crossroads between coagulation and signaling in physiology and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 14(10):429-440

- Brat DJ, Castellano-Sanchez AA, Hunter SB, Pecot M, Cohen C, Hammond EH, Devi SN, Kaur B, Van Meir EG. 2004. Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer Research*, 64(3):920-927
- Brat DJ, Van Meir EG. 2004. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Laboratory Investigation*, 84(4):397-405
- Bucher O, Wartenberg H. 1991. *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. Elfte Auflage. Bern, Stuttgart, Toronto: Verlag Hans Huber
- Camerer E, Huang W, Coughlin SR. 2000. Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci*, 97(10):5255-5260
- Chintala SK, Tonn JC, Rao JS. 1999. Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas. *Int J Devl Neuroscience*, 17(5-6):495-502
- Crossin KL, Krushel LA. 2000. Cellular Signaling by Neural Cell Adhesion Molecules of the Immunoglobulin Superfamily. *Dev Dyn*, 218(2):260-279
- Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM. 1987. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* 236(4803):799-806
- DAKO Cytomation. 1999. ChemMate™ Detektionskit, Alkaline Phosphatase/ Red, Kaninchen/ Maus; Instruction Manual
- Deryugina EI, Bourdon MA, Luo GX, Reisfeld RA, Strongin A. 1997. Matrix metalloproteinase-2 activation modulates glioma cell migration. *Journal of Cell Science* 110(Pt19): 2473-2482



- Du R, Petritsch C, Lu K, Liu P, Haller A, Ganss R, Song H, Vandenberg S, Bergers G. 2008. Matrix metalloproteinase-2 regulates vascular patterning and growth affecting tumor cell survival and invasion in GBM. *Neuro Oncol*, 10(3):254-264
- Dünisch P. 2008. Expressionsanalyse des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls Isoform 140 (NCAM-140) in humanen Gliomen im Vergleich zu anderen Hirntumoren und zu zerebralem Autopsiegewebe [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität
- Edvardsen K, Brünner N, Spang-Thomsen M, Walsh FS, Bock E. 1993. Migratory, invasive and metastatic capacity of NCAM transfected rat glioma cells. *Int J devel Neurosci*, 11(5):681-691
- Edvardsen K, Chen W, Rucklidge G, Walsh FS, Öbrink B, Bock E. 1993. Transmembrane neural cell-adhesion molecule (NCAM), but not glycosyl-phosphatidylinositol-anchored NCAM, down-regulates secretion of matrix metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci*, 90(24):11463-11467
- Edvardsen K, Pedersen PH, Bjerkvig R, Hermann GG, Zeuthen J, Laerum OD, Walsh FS, Bock E. 1994. Transfection of glioma cells with the neural-cell-adhesion molecule NCAM: effect on glioma-cell invasion and growth in vivo. *Int J Cancer*, 58(1):116-122
- Fernandes RS, Kirszberg C, Rumjanek VM, Monteiro RQ. 2006. On the molecular mechanisms for the highly procoagulant pattern of C6 glioma cells. *J Thromb Haemost*, 4(7):1546–1552.
- Furukawa Y, Kawano Y, Fukada J, Matsumoto H, Narahara H. 2009. The production of vascular endothelial growth factor and metalloproteinase via protease-activated receptor in human endometrial stromal cells. *Fertility and Sterility*, 91(2):535-541
- Giese A, Laube B, Zapf S, Mangold U, Westphal M. 1998. Glioma Cell Adhesion and Migration on Human Brain Sections. *Anticancer Research*, 18(4A):2435-2448

- Gingras MC, Roussel E, Bruner JM, Branch CD, Moser RP. 1995. Comparison of cell adhesion molecule expression between glioblastoma multiforme and autologous normal brain tissue. *J Neuroimmunol* 57(1-2):143-153
- Gorbacheva LR, Storozhevykh TP, Pinelis VG, Ishiwata S, Strukova SM. 2006. Modulation of Hippocampal Neuron Survival by Thrombin and Factor Xa. *Biochemistry (Mosc)*, 71(10):1082-1089
- Graham DI, Lantos PL, Hrsg. 2002. *Greenfield's Neuropathology*. Siebente Auflage. London: Arnold
- Grand RJA, Turnell AS, Grabham PW. 1996. Cellular consequences of thrombin-receptor activation. *Biochem J*, 313(Pt2):353-368
- Gratsa A, Rooprai H K, Rogers JP, Martin KK, Pilkington G. 1997. Correlation of Expression of NCAM and GD3 Ganglioside to Motile Behaviour in Neoplastic Glia. *Anticancer Research*, 17(6B): 4111-4117
- Greenberg MS. 2006. *Handbook of Neurosurgery*. Sechste Auflage. New York: Thieme
- Hees H, Sinowatz F. 2000. *Histologie: Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*. Dritte Auflage. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag
- Huang CX, Hu SX, Chen B. 2001. Expression of the neural cell adhesion molecule in human astrocytomas. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 26(6):543-545
- Hübschmann MV, Skladchikova G, Bock E, Berezin V. 2005. Neural cell adhesion molecule function is regulated by metalloproteinase-mediated ectodomain release. *Neurosci Res*, 80(6):826-837
- Jäälinojä J, Herva R, Korpela M, Höyhtyä M, Turpeenniemi-Hujanen T. 2000. Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) immunoreactive protein is associated with poor grade and survival in brain neoplasms. *Journal of Neuro-Oncology*, 46(1):81-90

- Jiang X, Bailly MA, Panetti TS, Cappello M, Konigsberg WH, Bromberg ME. 2004. Formation of tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex promotes cellular signaling and migration of human breast cancer cells. *J Thromb Haemost*, 2(1):93-101
- Junqueira U, Carneiro J. 2005. Histologie. Sechste Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag
- Kachra Z, Beaulieu E, Delbecchi L, Mousseau N, Berthelet F, Moumdjian R, Del Maestro R, Béliveau R. 1999. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human brain tumors. *Clinical & Experimental Metastasis*, 17(7): 555-566
- Kahle W, Frotscher M. 2002. Taschenatlas der Anatomie: 3 Nervensystem und Sinnesorgane. Achte korrigierte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag
- Kanu OO, Mehta A, Di C, Lin N, Bortoff K, Bigner DD, Yan H, Adamson DC. 2009. Glioblastoma multiforme: a review of therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets*, 13(6):701-718
- Kargiotis O, Chetty C, Gondi CS, Tsung AJ, Dinh DH, Gujrati M, Lakka SS, Kyritsis AP, Rao JS. 2008. Adenovirus-mediated transfer of siRNA against MMP-2 mRNA results in impaired invasion and tumor-induced angiogenesis, induces apoptosis in vitro and inhibits tumor growth in vivo in glioblastoma. *Oncogene*, 27(35):4830-4840
- Kaufmann R, Patt S, Schafberg H, Kalff R, Neupert G, Nowak G. 1998. Functional thrombin receptor PAR1 in primary cultures of human glioblastoma cells. *Molecular Neuroscience*, 9(4):709-712
- Kiselyov VV, Soroka V, Berezin V, Bock E. 2005. Structural biology of NCAM homophilic binding and activation of FGFR. *Journal of Neurochemistry*, 94(5):1169-1179
- Kiss JZ. 1998. A role of adhesion molecules in neuroglial plasticity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 140(1-2):89-94

- Kleihues P, Cavenee WK, Hrsg. 2000. Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. Zweite Auflage. Lyon: IARC Press
- Koblitz J. 2005. Bedeutung des Neuralen Zelladhäsionsmoleküls Isoform 140 (NCAM-140) für die Biologie humaner hirneigener Tumore [Diplomarbeit]. Jena: Fachhochschule
- Komatsu K, Nakanishi Y, Nemoto N, Hori T, Sawada T, Kobayashi M. 2004. Expression and quantitative analysis of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human gliomas. *Brain Tumor Pathol*, 21(3):105-112
- Krushel LA, Sporns O, Cunningham BA, Crossin KL, Edelman GM. 1995. The neural cell adhesion molecule (N-CAM) inhibits astrocyte proliferation after injury to different regions of the adult rat brain. *Proc Natl Acad Sci*, 92(10):4323-4327
- Krushel LA, Tai MH, Cunningham BA, Edelman GM, Crossin KL. 1998. Neural cell adhesion molecule (N-CAM) domains and intracellular signaling pathways involved in the inhibition of astrocyte proliferation. *Proc Natl Acad Sci*, 95(5):2592-2596
- Kunishio K, Okada M, Matsumoto Y, Nagao S. 2003. Matrix metalloproteinase-2 and -9 expression in astrocytic tumors. *Brain Tumor Pathol*, 20(2):39-45
- Lampert K, Machein U, Machein MR, Conca W, Peter HH; Volk B. 1998. Expression of Matrix Metalloproteinases and Their Tissue Inhibitors in Human Brain Tumors. *American Journal of Pathology*, 153(2):429-437
- Le DM, Besson A, Fogg DK, Choi KS, Waisman DM, Goodyer CG, Rewcastle B, Yong VW. 2003. Exploitation of Astrocytes by Glioma Cells to Facilitate Invasiveness: A Mechanism Involving Matrix Metalloproteinase-2 and the Urokinase-Type Plasminogen Activator-Plasmin Cascade. *The Journal of Neuroscience*, 23(10):4034-4043
- Leadley JR jr, Chi L, Porcari AR. 2001. Non-hemostatic activity of coagulation factor Xa: potential implications for various diseases. *Current Opinion in Pharmacology*, 1(2):169-175

- Linnemann M, Kühl M. 2002. Biochemie für Mediziner: ein Lern- und Arbeitsbuch mit klinischem Bezug. Sechste Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag
- Liotta LA, Thorgeirsson UP, Garbisa S. 1982. Role of collagenases in tumor cell invasion. *Cancer Metastasis Review*, 1(4):277-288
- Löffler G, Petrides PE. 2003. Biochemie und Pathobiochemie. Siebente Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. 2007. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol*, 114(2):97-109
- Lu KV, Jong KA, Rajasekaran AK, Cloughesy TF, Mischel PS. 2004. Upregulation of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 promotes matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation and cell invasion in a human glioblastoma cell line. *Laboratory Investigation*, 84(1):8-20
- Lüllmann-Rauch R. 2006. Taschenlehrbuch Histologie. Zweite Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag
- Maidment SL, Rucklidge GJ, Rooprai HK, Pilkington GJ. 1997. An inverse correlation between expression of NCAM-A and the matrix-metalloproteinases gelatinase-A and gelatinase-B in human glioma cells in vitro. *Cancer Letters*, 116(1):71-77
- McCawley LJ, Matrisian LM. 2000. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today*, 6(4):149-156
- Morris DR, Ding Y, Ricks TK, Gullapalli A, Wolfe BL, Trejo J. 2006. Protease-Activated Receptor-2 is Essential for Factor VIIa and Xa-Induced Signaling, Migration, and Invasion of Breast Cancer Cells. *Cancer Res*, 66(1):307-314
- Moskopp D, Wassmann H, Hrsg. 2005. Neurochirurgie: Handbuch für die Weiterbildung und interdisziplinäres Nachschlagewerk. Erste Auflage. Stuttgart: Schattauer GmbH

- Nagase H, Woessner JF Jr. 1999. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem*, 274(31):21491-21494
- Nakada M, Nakamura H, Ikeda E, Fujimoto N, Yamashita J, Sato H, Seiki M, Okada Y. 1999. Expression and tissue localization of membrane-type 1, 2 and 3 matrix metalloproteinases in human astrocytic tumors. *Am J Pathol*, 154(2):417-428
- Nakada M, Okada Y, Yamashita J. 2003 The role of matrix metalloproteinases in glioma invasion. *Frontiers in Bioscience* 8:e261-269
- Nakagawa T, Kubota T, Kabuto M, Fujimoto N, Okada Y. 1996. Secretion of matrix metalloproteinase-2 (72kD gelatinase/type IV collagenase = gelatinase A) by malignant human glioma cell lines: implications for the growth and cellular invasion of the extracellular matrix. *Journal of Neuro-Oncology*, 28(1):13-24
- Nielsen J, Kulahin N, Walmod PS. 2008. Extracellular Protein Interactions Mediated by the Neural Cell Adhesion Molecule, NCAM: Heterophilic Interactions Between NCAM and Cell Adhesion Molecules, Extracellular Matrix Proteins, and Viruses. Epub ahead of print
- Nierodzik ML, Karparkin S. 2006. Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant phenotype. *Cancer Cell*, 10(5):355-362
- Okamoto T, Nishibori M, Sawada K, Iwagaki H, Nakaya N, Jikuhara A, Tanaka N, Saeki K. 2001. The effects of stimulating protease-activated receptor-1 and -2 in A172 human glioblastoma. *J Neural Transm*, 108(2):125-140
- Ornstein DL, Kenneth KR, Zacharski, LR. 2002. The Coagulation System as a Target for the Treatment of Human Gliomas. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 28(1):19-28
- Ossovskaya VS, Bunnett NW. 2004. Protease-Activated Receptors: Contribution to Physiology and Disease. *Physiol Rev*, 84(2):579-621



- Owens GC, Orr EA, Kleinschmidt DeMasters BK, Muschel RJ, Berens ME, Kruse CA. 1998. Overexpression of a Transmembrane Isoform of Neural Cell Adhesion Molecule Alters the Invasiveness of Rat CNS-1 Glioma. *Cancer Research*, 58(9):2020-2028
- Pagenstecher A, Wussler EM, Opdenakker G, Volk B, Campbell IL. 2001. Distinct Expression Patterns and Levels of Enzymatic Activity of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Primary Brain Tumors. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 60(6):598-612
- Prag S, Lepekhn EA, Kolkova K, Hartmann-Petersen R, Kawa A, Walmod PS, Belman V, Gallagher HC, Berezin V, Bock E, Pedersen N. 2002. NCAM regulates cell motility. *Journal of Cell Science*, 115(2):283-292
- Raithatha SA, Muzik H, Rewcastle NB, Johnston RN, Edwards DR, Forsyth PA. 2000. Localization of gelatinase-A and gelatinase-B mRNA and protein in human gliomas. *Neuro-oncology*, 2(3):145-150.
- Ranheim TS, Edelman GM, Cunningham BA. 1996. Homophilic adhesion mediated by the neural cell adhesion molecule involves multiple immunoglobulin domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(9):4071-4075
- Rauch BH, Bretschneider E, Braun M, Schrör K. 2002. Factor Xa Releases Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) From Human Vascular Smooth Muscle Cells and Stimulates the Conversion of Pro-MMP-2 to MMP-2: Role of MMP-2 in Factor Xa-Induced DNA Synthesis and Matrix Invasion. *Circ Res*, 90(10):1122-1127
- Rong Y, Post DE, Pieper RO, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ. 2005. PTEN and Hypoxia Regulate Tissue Factor Expression and Plasma Coagulation by Glioblastoma. *Cancer Res*, 65(4):1406-1413
- Rønn LCB, Hartz BP, Bock E. 1998. The Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) in Development and Plasticity of the Nervous System. *Experimental Gerontology*, 33(7/8):853-864

- Ruf W, Dorfleutner A, Riewald M. 2003. Specificity of coagulation factor signaling. *J Thromb Haemost*, 1(7):1495-1503
- Sasaki H, Yoshida K, Ikeda E, Asou H, Inaba M, Otani M, Kawase T. 1998. Expression of the Neural Cell Adhesion Molecule in Astrocytic Tumors: an Inverse Correlation with Malignancy. *Cancer*, 82(10):1921-1931
- Sawaya R, Glass-Greenwalt P. 1992. Postoperative venous thromboembolism and brain tumors: Part II Hemostatic profile. *J Neurooncol*, 14(2):127-134
- Sawaya RE, Yamamoto M, Gokaslan ZL, Wang SW, Mohanam S, Fuller GN, McCutcheon IE, Stetler-Stevenson WG, Nicolson GL, Rao JS. 1996. Expression and localization of 72 kDa type IV collagenase (MMP-2) in human malignant gliomas in vivo. *Clin Exp Metastasis*, 14(1):35-42
- Schirmer M. 2005. *Neurochirurgie*. Zehnte Auflage. München: Urban & Fischer Verlag
- Schlegel U, Weller M, Westphal M, Hrsg. 2003. *Neuroonkologie*. Zweite erweiterte Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag
- Senden NH, Jeunhomme TM, Heemskerk JW, Wagenvoord R, van't Veer C, Hemker HC, Buurman WA. 1998. Factor Xa induces cytokine production and expression of adhesion molecules by human umbilical vein endothelial cells. *The Journal of Immunology*, 161(8):4318-4324
- Shikamoto Y, Morita T. 1999. Expression of factor X in both the rat brain and cells of the central nervous system. *FEBS Letters*, 463(3):387-389
- Shin MH, Lee EG, Lee SH, Son H. 2002. Neural cell adhesion molecule (NCAM) promotes the differentiation of hippocampal precursor cells to a neuronal lineage, especially to a glutamatergic neural cell type. *Experimental and Molecular Medicine*, 34(6):401-410
- Soroka V, Kasper C, Poulsen FM. 2008. Structural Biology of NCAM. Epub ahead of print

- Soroka V, Kolkova K, Kastrup JS, Diederichs K, Breed J, Kiselyov VV, Poulsen FM, Larsen IK, Welte W, Berezin V, Bock E, Kasper C. 2003. Structure and Interactions of NCAM Ig1-2-3 Suggest a Novel Zipper Mechanism for Homophilic Adhesion. *Structure*, 11(10):1291-1301.
- Sporns O, Edelman GM, Crossin KL. 1995. The neural cell adhesion molecule (N-CAM) inhibits proliferation in primary cultures of rat astrocytes. *Proc Natl Acad Sci*, 92(2):542-546
- Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. 1995. Mechanism Of Cell Surface Activation Of 72-kDa Type IV Collagenase. *The Journal of Biological Chemistry* 270(10):5331-5338
- Suzuki M, Suzuki M, Nakayama J, Suzuki A, Angata K, Chen S, Sakai K, Hagihara K, Yamaguchi Y, Fukuda M. 2005. Polysialic Acid facilitates tumor invasion by glioma cells. *Glycobiology*, 15(9):887-894
- Tews DS, Nissen A. 1998-99. Expression of adhesion factors and degrading proteins in primary and secondary glioblastomas and their precursor tumors. *Invasion Metastasis*, 18(5-6):271-284
- Thier M, Roeb E, Breuer B, Bayer TA, Halfter A, Weis J. 2000. Expression of matrix metalloproteinase-2 in glial and neural tumor cell lines: inverse correlation with proliferation rate. *Cancer Letter*, 149(1-2):163-170
- Thomas C. 2006. *Histopathologie: Lehrbuch und Atlas zur Befunderhebung und Differenzialdiagnostik*. Vierzehnte Auflage. Stuttgart: Schattauer GmbH
- Todaro L, Christiansen S, Varela M, Campodónico P, Pallotta MG, Lastiri J, Sacerdote de Lustig E, Bal de Kier Joffé E, Puricelli L. 2007. Alteration of serum and tumoral neural cell adhesion molecule (NCAM) isoforms in patients with brain tumors. *J Neurooncol*, 83(2):135-144

- Tonn JC, Goldbrunner R. 2003. Mechanisms of glioma cell invasion. *Acta Neurochir*, 88:163-167
- Trepel M. 2008. *Neuroanatomie: Struktur und Funktion*. Vierte Auflage. München: Urban & Fischer Verlag
- Vince GH, Wagner S, Pietsch T, Klein R, Goldbrunner RH, Roosen K, Tonn JC. 1999. Heterogenous regional expression patterns of matrix metalloproteinases in human malignant gliomas. *Int J Devl Neuroscience*, 17(5):437-445
- Walmod PS, Kolkova K, Berezin V, Bock E. 2004. Zippers Make Signals: NCAM-mediated Molecular Interactions and Signal Transduction. *Neurochemical Research*, 29(11):2015-2035
- Wang H, Uhl JJ, Reiser G. 2002. Four Subtypes of Protease-Activated Receptors, Co-expressed in Rat Astrocytes, Evoke Different Physiological Signaling. *Glia*, 37(1):53–63
- Weller M. 2004. *Interdisziplinäre S 2 – Leitlinie für die Diagnostik und Therapie der Gliome des Erwachsenenalters*. München, Bern, Wien New York: Zuckerschwerdt Verlag
- Welsch U. 2006. *Lehrbuch Histologie*. Zweite Auflage. München: Urban & Fischer Verlag
- Wilson SR, Gallagher S, Warpeha K, Hawthorne SJ. 2004. Amplification of MMP-2 and MMP-9 production by prostate cancer cell lines via activation of protease-activated receptors. *Prostate*, 60(2):168-174
- Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Klement P, Rak J. 2001. The Hemostatic System and Angiogenesis in Malignancy. *Neoplasia*, 3(5):371-384
- Yamada T, Nagai Y. 1996. Immunohistochemical studies of human tissues with antibody to factor Xa. *Histochemical Journal*, 28(1):73-77

Yano H, Hara A, Murase S, Hayashi K, Ando H, Shinoda J, Shimokawa K, Sakai N. 2001. Expression of hepatocyte growth factor and matrix metalloproteinase-2 in human glioma. *Brain Tumor Pathol*, 18(1):7-12

Zacharski LR, Dunwiddie C, Nutt EM, Hunt J, Memoli VA. 1991. Cellular localization of activated factor X by Xa-specific probes. *Thromb Haemost*, 65(5):545-548

## **10 Anhang**

### **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. R. Kalff ganz herzlich für die Möglichkeit bedanken, dieses interessante Thema erforschen zu können und dafür persönliche Unterstützung erhalten zu haben. Ganz besonders hilfreich war dabei die Erlaubnis, die Arbeitsräume, die Geräte und das Material des neuroonkologischen Forschungslabors der Klinik für Neurochirurgie Jena nutzen zu dürfen. Mein besonderer Dank gilt Dr. S. Kuhn für die Vergabe des Promotionsthemas, die hilfreiche Unterstützung bei vielfältigen Fragestellungen und die Beratung bei der Bearbeitung und Fertigstellung der Promotion.

Ebenso gilt mein Dank Prof. Dr. D. Katenkamp und den Mitarbeitern des Pathologischen Instituts des Universitätsklinikums Jena für die Bereitstellung der technischen Geräte und Laboratorien sowie die Bereitstellung der fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben. Bedanken möchte ich mich insbesondere bei C. Martin für die Unterstützung bei praktischen Fragestellungen und der Durchführung der H/E-Färbung.

Weiterhin gilt mein Dank dem Pathologen Dr. M. Brodhun für die Unterstützung bei der Auswahl geeigneter Gewebeproben und für die Markierung von Tumor- und Invasionszone der Glioblastomproben.

Bei Dr. R. Vollandt und Dr. M. Walther des Instituts für medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation des Universitätsklinikums Jena möchte ich mich bedanken für die hilfreiche Beratung im Zusammenhang mit der statistischen Auswertung der gewonnenen Daten.

Mein besonderer Dank gilt allen Freunden und Menschen, die mich während dieser Arbeit begleitet und immer wieder mit wertvollen Hinweisen unterstützt haben. F. Leister danke ich für das Engagement bei der sprachlichen Korrektur meiner Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Mutter bedanken, die zur Ermöglichung meines Studiums erheblich beigetragen hat. Ihr, meiner Familie und meinem Freund gilt mein großer Dank dafür, dass sie mir mit bedingungsloser persönlicher Unterstützung zur Seite standen.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Stefanie Maria Kellmann  
Geboren am: 07. Dezember 1983 in Waltershausen

### **Schulausbildung**

09/1990 – 08/1994 Grundschule „GuthsMuths-Oberschule“  
09/1994 – 06/2002 Gymnasium „Am Körnberg“ Friedrichroda  
Abschluss: Abitur mit der Gesamtnote sehr gut (1,0)

### **Studium**

10/2002 – 09/2004 Vorklinisches Studium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Abschluss: Ärztliche Vorprüfung mit der Gesamtnote gut (2,0)  
10/2004 – 07/2007 Klinisches Studium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
08/2007 – 07/2008 Praktisches Jahr  
08/2008 – 03/2009 Fortführung der Promotion und Vorbereitung auf das Examen  
04/2009 Abschluss des Medizinstudiums: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen  
Prüfung mit der Gesamtnote sehr gut (1,5)  
05/2009 – 06/2009 Fertigstellung der Promotion  
ab 08/2009 Ärztin in Weiterbildung in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin  
des Heinrich-Braun-Klinikums Zwickau gGmbH  
  
04/2004 - 04/2009 Stipendiatin des Cusanuswerks, Bischöfliche Studienförderung

### **Praktische Erfahrungen**

03/2004 – 03/2007 Famulaturen in Herdecke (Neurologie), Filderstadt (Innere),  
Stavanger/Norwegen (Chirurgie), Berlin (Pädiatrie)  
und Dhamtari/Indien (Gynäkologie)  
08/2007 – 07/2008 Praktisches Jahr:  
I. Tertial: Innere Medizin, Thüringen-Kliniken gGmbH Rudolstadt  
II. Tertial: Pädiatrie, Heliosklinikum GmbH Erfurt  
III. Tertial: Chirurgie, St. Olavs Hospital - Universitetssykehuset  
Trondheim/Norwegen

**Jena, 29. Juni 2009**



## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. R. Kalff, Dr. S. A. Kuhn, Dr. M. Brodhun, C. Martin und F. Leister,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 29. Juni 2009